

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LES VARIATIONS DE VIRULENCE DES BACILLES TUBERCULEUX DE TYPE HUMAIN

par L. NÈGRE, J. BRETEY, R. LAVAUX et M^{lle} SIMONET.

*(Institut Pasteur.
Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)*

Au cours des recherches que nous effectuons pour identifier certaines souches de bacilles tuberculeux qui nous ont été confiées ou que nous avons isolées nous-mêmes de divers produits pathologiques, nous avons eu l'occasion d'étudier des germes d'origine humaine, atypiques par leur pouvoir pathogène prononcé pour le lapin après inoculation intraveineuse (1).

Dans le présent travail, nous nous proposons de décrire les caractères d'une souche de bacilles de Koch provenant des selles d'un enfant tuberculeux. Cette souche, bien que paraissant appartenir au type humain, a présenté, pendant les premiers mois qui ont suivi son isolement, une certaine virulence pour la poule.

Elle provenait d'un enfant (enfant D...), mort le 8 février 1937, à l'âge de cinq mois et demi, d'une lobite supérieure droite dont l'évolution a commencé à la fin du mois de

(1) Ces *Annales*, 61, août 1938, p. 109.

novembre 1936. Cet enfant avait été séparé, dès sa naissance, de sa mère tuberculeuse, vacciné par absorption de BCG et placé dans un préventorium. Comme cette femme était gravement infectée et est morte deux mois après son accouchement, il est vraisemblable de supposer que la contamination s'était faite *in utero*. Il ne nous a pas été possible d'identifier le bacille qui a déterminé la tuberculose de la mère, mais la souche qui a été isolée des lésions pulmonaires de l'enfant avait tous les caractères d'un bacille humain typique. Elle s'est développée en colonies rugueuses et eugoniques dont les bacilles, virulents pour le cobaye, ne donnaient aucune lésion au lapin et à la poule par inoculation intraveineuse de 1 milligramme et de 0 milligr. 01.

Au début de la maladie de cet enfant, un examen microscopique, effectué le 19 décembre 1936 par l'un d'entre nous, a révélé la présence dans les selles de quelques bacilles acido-résistants. Un nouvel examen, pratiqué un mois plus tard, a montré un nombre encore plus élevé de ces germes.

Après traitement par la soude, ces selles ont étéensemencées, le 19 janvier 1937, sur le milieu de Petragnani, par M^{lle} Simonet. Sur les tubesensemencés se sont développées des colonies hémisphériques d'apparence lisse, mais non rugueuses, se détachant en bloc du milieu de culture. Comme il s'agissait de colonies à aspect lisse, ces bacilles ont été inoculés non seulement au cobaye et au lapin, mais à la poule.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA SOUCHE DES SELLES AU MOMENT DE SON ISOLEMENT.

EXPÉRIENCE. — Trois cobayes sont inoculés, le 9 février 1937, sous la peau de la cuisse droite, avec 1 milligramme de cette souche. Un mois après, ils sont sacrifiés ; ils présentent de petits ganglions sous-lombaires droits, hypertrophiés, non caséeux, et de nombreuses granulations sur la rate. L'un d'eux a quelques tubercules sur les poumons. Des fragments des rates sont broyés et réinoculés sous la peau de 3 cobayes, qui meurent tuberculeux.

EXPÉRIENCE. — Le 15 mai 1937, 2 lapins sont inoculés dans la veine avec 0 milligr. 01 de cette souche. L'un meurt prématurément, quinze jours après, sans lésions. L'autre, sacrifié un mois après l'inoculation, présente quelques granulations sur les poumons. Les autres organes sont apparemment indemnes.

EXPÉRIENCE. — Deux poules sont inoculées, le 15 mars 1937, dans la veine, l'une avec 1 milligramme, l'autre avec 0 milligr. 01 de cette souche. Celle qui a reçu 1 milligramme meurt trois semaines après l'inoculation avec un amaigrissement et une cachexie prononcés. Il n'y a pas de lésions visibles sur le foie et la rate, mais les frottis de ces organes contiennent de nombreux bacilles acido-résistants. La poule inoculée avec 0 milligr. 01 est sacrifiée deux mois après l'inoculation. Elle n'est pas amaigrie et ses organes ne contiennent pas de bacilles.

La souche, isolée des selles de cet enfant et caractérisée au moment de son isolement par l'apparence lisse de ses colonies sur le milieu de Petraghani, était donc virulente pour le cobaye, comme la souche à colonies rugueuses provenant des lésions pulmonaires du même enfant, mais elle présentait, en outre, un certain pouvoir pathogène pour le lapin et pour la poule après inoculation intraveineuse, alors que la souche à colonies rugueuses en était dépourvue.

Au premier réensemencement sur le milieu de Löwenstein, les colonies de la souche isolée des selles avaient encore la même apparence lisse, mais, par la suite, elles sont devenues rugueuses aussi bien sur les milieux à l'œuf que sur pomme de terre glycinée. En milieu liquide de Sauton, la culture de ces bacilles se développait uniquement en voile à la surface, sans trouble dans la profondeur.

Malgré ce dernier caractère, on pouvait se demander si le bacille de type humain, agent de la tuberculose de cet enfant, ne s'était pas mélangé à un bacille de type aviaire, hôte accidentel. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué deux dilutions de la suspension en eau physiologique des bacilles de la souche des selles, l'une à 0 milligr. 0001 et l'autre à 0 milligr. 00001 par centimètre cube, et nous avons ensemencé 11 gouttes de ces dilutions sur plusieurs tubes de milieu de Löwenstein de façon à avoir des colonies provenant d'un germe unique. Toutes celles qui se sont développées présentaient un aspect rugueux. Nous n'avons pas pu distinguer parmi elles une seule colonie à aspect lisse.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA SOUCHE DES SELLES
SIX MOIS APRÈS SON ISOLEMENT.

Nous avons alors, six mois après son isolement, éprouvé de nouveau pour le lapin et pour la poule, la virulence de cette souche qui paraissait constituée par des germes à l'état pur.

EXPÉRIENCE. — Le 25 juin 1937, 2 lapins sont inoculés dans la veine, l'un avec 1 milligramme, l'autre avec 0 milligr. 01 de cette souche. Le lapin inoculé avec 1 milligramme meurt, un mois après l'inoculation, sans lésions. Sa rate contient de rares bacilles. Celui inoculé avec 0 milligr. 01 est sacrifié deux mois après l'inoculation et n'a pas de lésions.

EXPÉRIENCE. — Une poule reçoit, le 25 juin 1937, dans la veine, 1 milligramme de cette souche. Elle meurt, trois semaines après l'inoculation, amaigrie, sans lésions macroscopiques des organes, mais avec d'assez nombreux bacilles dans le foie et dans la rate.

Cette souche avait donc conservé pour la poule à peu près le même pouvoir pathogène qu'au moment de son isolement, six mois auparavant. Nous avons, d'autre part, constaté que la souche isolée des poumons était toujours avirulente pour la poule après inoculation intraveineuse de 1 milligramme.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA SOUCHE DES SELLES
UN AN APRÈS SON ISOLEMENT.

Nous avons attendu un autre délai de six mois et nous avons de nouveau éprouvé la virulence de cette souche pour le cobaye, le lapin et la poule.

EXPÉRIENCE. — Trois cobayes sont inoculés, le 10 décembre 1937, sous la peau de la cuisse, avec 1 milligramme de cette souche. Ces animaux meurent au bout de six semaines environ avec des lésions tuberculeuses sur tous les organes.

EXPÉRIENCE. — Deux lapins sont inoculés dans la veine, le 10 décembre 1937, avec 0 milligr. 01 de cette souche. Ils sont sacrifiés cinq semaines après l'inoculation. L'un et l'autre présentent quelques tubercules sur les poumons et plusieurs granulations sur chaque rein.

EXPÉRIENCE. — Deux poules sont inoculées dans la veine, le 10 décembre 1937, avec 10 milligrammes de cette souche. Sacrifiées deux

trois mois après l'inoculation, elles n'ont aucune lésion sur leurs organes, qui ne contiennent pas de bacilles.

Après un an de réensemencements sur les milieux artificiels, le pouvoir pathogène que cette souche avait présenté pour la poule a donc complètement disparu, mais comme elle montrait une légère virulence pour le lapin, nous l'avons inoculée à cet animal par voie sous-occipitale et par voie intrapleurale.

EXPÉRIENCE. — Le 14 mars 1938, 4 lapins reçoivent dans la veine 0 milligr. 01 de cette souche. Deux d'entre eux sont sacrifiés deux mois après cette inoculation. Ils présentent chacun une dizaine de fines granulations sur les poumons. Les autres organes sont indemnes. Les deux autres lapins sont sacrifiés trois mois après l'inoculation. Leurs poumons présentent aux bases quelques rares tubercules. Les autres organes ne paraissent pas atteints.

EXPÉRIENCE. — Deux lapins reçoivent, le 14 mars 1938, une inoculation sous-occipitale de 0 milligr. 01 de cette souche. Ils ne présentent, par la suite, aucune paralysie. Sacrifiés deux mois après l'inoculation, ils n'ont aucune lésion.

EXPÉRIENCE. — Deux lapins sont inoculés, le 21 septembre 1938, dans la plèvre du côté droit avec les lésions pulmonaires broyées et émulsionnées en eau physiologique d'un lapin qui avait reçu dans la veine 0 milligr. 01 de cette souche. Sacrifiés neuf semaines après cette inoculation, l'un n'a que deux petits tubercules sur la plèvre pariétale droite, l'autre deux tubercules sur la plèvre pariétale du même côté et de nombreux tubercules sur les poumons. Les autres organes sont indemnes.

La souche isolée des selles, malgré le pouvoir pathogène qu'elle a présenté pour la poule pendant les six mois qui ont suivi son isolement et la légère virulence qu'elle a montrée dans certains cas pour le lapin, se comporte donc, quand on utilise les voies méningée et pleurale, comme un bacille humain typique.

CONCLUSIONS.

Il résulte de ces faits que nous avons isolé, à partir du même enfant, deux souches de bacilles tuberculeux qui ont présenté des caractères légèrement différents.

Celle qui provenait des lésions pulmonaires s'est développée sur les milieux à l'œuf en colonies rugueuses et eugoniques ; elle est virulente pour le cobaye et n'a montré aucun pouvoir

pathogène pour le lapin et pour la poule inoculés par la voie veineuse aux doses de 1 milligramme et 0 milligr. 01.

Par contre, la souche obtenue par l'ensemencement des selles sur le milieu de Petraghani a poussé sous la forme de colonies d'apparence lisse, non crémeuses, mais non adhérentes au milieu. Elles ont pris un aspect rugueux dans les réensemencements ultérieurs. Cette souche a présenté, dans certains cas, après inoculation intraveineuse de 0 milligr. 01, une virulence pour le lapin légèrement plus prononcée que celle isolée des poumons du même enfant. Pendant les six mois qui ont suivi leur isolement, ces germes inoculés à la poule, par la voie veineuse, à la dose de 1 milligramme, ont tué cet animal en trois semaines avec un amaigrissement prononcé et de nombreux bacilles dans les organes.

Puisqu'on peut éliminer l'hypothèse d'une contamination de ces germes par un bacille aviaire présent dans l'intestin, il paraît ressortir de ces faits que la souche isolée des selles de l'enfant D..., quoique de type humain, a présenté, pendant les six mois qui ont suivi son isolement, un certain pouvoir pathogène pour la poule.

Comme il ne s'agit que d'un cas unique, nous ne voulons en tirer aucune conclusion et nous nous bornons à verser cette observation dans le dossier des variations de virulence des bacilles tuberculeux des mammifères.

**RÉACTIONS HYPERERGIQUES D'ÉPREUVE
CHEZ DES LAPINS SENSIBILISÉS
PAR DES BACILLES TUBERCULEUX MORTS
OU AVIRULENTS
"TOXICITÉ" DU BACILLE AVIAIRE**

par F. VAN DEINSE,

avec la collaboration de R. SCHWARTZ et J. SOLOMIDÈS.

Au cours des recherches que nous poursuivons depuis plusieurs années, concernant la prémunition des lapins au moyen de bacilles tuberculeux de type aviaire tués par chauffage, vis-à-vis d'une inoculation massive de bacilles aviaires vivants, nous avons observé certains cas de mort rapide, due à des réactions d'hyperergie, cas déjà décrits dans une note à la Société de Biologie (1) et que nous allons reproduire sommairement dans le présent travail.

Rappelons d'abord que l'inoculation par voie intraveineuse au lapin neuf d'une dose convenable (1 milligramme) d'une culture de bacilles tuberculeux de type aviaire fortement pathogène, est suivie d'une toxi-infection rapidement mortelle, dite du « type Yersin », d'après l'auteur qui a, le premier, étudié cette forme de tuberculose expérimentale (2). Elle fut étudiée ensuite par Straus et Gamaleia (3). Nous-même en avons repris l'étude avec notre regretté collaborateur M.-A. Domanski, et lui avons consacré un mémoire (4). Il résulte des différentes recherches sur la toxi-infection du type Yersin que, dans cette maladie à allure septicémique et dont l'issue est fatale, la mort ne survient jamais avant le douzième jour. On voit que l'inoculation intraveineuse d'une forte dose de bacilles aviaires vivants

(1) *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 202.

(2) *Ces Annales*, **2**, 1888, p. 245.

(3) *Arch. de Méd. Exp.*, **31**, 1891, p. 457.

(4) *Ces Annales*, **59**, 1937, p. 182.

au lapin est d'abord suivie d'une période d'incubation, pendant laquelle l'animal ne présente aucun signe anormal, et que c'est à partir du huitième jour seulement que le lapin commence à réagir par de la fièvre. Les animaux qui meurent le douzième jour, apparemment encore en pleine santé, semblent mourir plutôt par choc et l'on est tenté d'attribuer cette mort soudaine au développement de l'allergie, plus ou moins précoce selon l'animal, mais jamais suffisamment épanouie avant le douzième jour. A partir de ce moment, et d'après les dispositions individuelles de l'animal en question, celui-ci mourra ou bien par choc, ou bien se cachectisera sous l'influence des poisons bacillaires.

Tel est le tableau, sommairement esquissé, de la toxi-infection tuberculeuse du type Yersin, se produisant chez le lapin à la suite d'une inoculation intraveineuse d'une dose convenable de bacilles aviaires.

Or, voici maintenant brièvement exposé le protocole de l'expérience au cours de laquelle se sont produits les cas d'hyperergie et de mort rapide, auxquels nous venons de faire allusion dans les premières lignes de ce mémoire.

EXPÉRIENCE. — Sept lapins sont injectés par voie intramusculaire avec 1 milligramme de corps bacillaires aviaires tués par chauffage et séchés, émulsionnés dans 1 cent. cube d'un mélange de paraffines à point de fusion 45°. Quatre d'entre eux reçoivent, six mois plus tard, une injection intraveineuse de 2 milligrammes d'une culture aviaire (Tr. IX) vivante. Ces 4 lapins meurent respectivement en sept, sept, neuf et onze jours, présentant à l'autopsie les images caractéristiques d'une toxi-infection « Yersin ». Deux lapins témoins, inoculés le même jour, avec la même dose de la même culture, par voie veineuse, sont morts respectivement après quatorze et vingt-quatre jours d'une tuberculose « Yersin ». Les trois autres lapins ont été éprouvés à leur tour sept mois après l'inoculation paraffinée ; cette fois, par l'injection intraveineuse de 1/5 de milligramme de bacilles aviaires Tr. IX vivants. Deux de ces derniers meurent respectivement en six et huit jours d'une toxi-infection « Yersin », le troisième en dix-huit jours. Deux lapins témoins, inoculés le même jour avec 1/5 de milligramme de cette souche, sont morts respectivement après onze jours (pneumococcie), et vingt jours (« Yersin »).

Nous avons cru pouvoir expliquer ces morts rapides, avant le douzième jour, survenues chez la plupart des lapins traités au préalable par une injection de bacilles aviaires morts paraffinés (et que nous avons proposé d'appeler « toxi-infection type

Yersin en raccourci »), par le fait que les lapins en question étaient très fortement allergisés (comme l'avait bien montré Coulaud), qu'ils n'avaient donc pas besoin du délai de douze jours pour s'allergiser comme les lapins neufs et que, pour cette raison, la mort pouvait survenir chez eux bien avant le douzième jour. Il s'agissait, par conséquent, d'une hyperergie préexistante.

Des observations d'hyperergie expérimentale ont été consignées dans la littérature bien avant les nôtres. En 1891 déjà, J. Grancher et Ledoux-Lebard (5), étudiant les effets d'inoculations de doses croissantes de bacilles aviaires au lapin, notèrent que des phénomènes aigus peuvent survenir à la suite d'une de ces surinfections.

Straus et Gamaleia (6), en injectant à des lapins des doses pas trop fortes de bacilles tuberculeux de type humain, virent les animaux maigrir d'abord, puis reprendre leur poids primitif ; inoculés à ce moment par voie veineuse avec des bacilles vivants ou morts, les animaux mouraient généralement au bout de vingt-quatre heures.

De la même époque datent les expériences de J. Grancher et H. Martin (7). Ces auteurs ont vacciné des lapins par des injections intraveineuses de bacilles aviaires atténués par vieillissement. Un lapin meurt le lendemain de l'épreuve (injection intraveineuse de bacilles aviaires pleinement virulents) ; comme cause de la mort, les auteurs notent : « intoxication par la tuberculine ». Trois lapins meurent avant les témoins (« le traitement les mettait à l'abri du bacille, tout en les livrant à l'action nocive de la tuberculine », disent les auteurs dans leur commentaire). Un lapin meurt deux jours après la neuvième injection vaccinale, ayant une congestion intense de la rate, du foie et des poumons : les auteurs croient à une infection intercurrente, mais on verra plus loin la ressemblance de ce cas avec nos observations.

Voici maintenant quelques observations plus récentes :

Élise S. L'Espérance (8) a vu que des cobayes préparés par

(5) *Arch. de Méd. Exp.*, 3, 1891, p. 145.

(6) *Arch. de Méd. Exp.*, 3, 1891, p. 705.

(7) *Rev. de la Tuberc.*, 1, 1893, p. 289.

(8) *J. of Immunol.*, 16, 1929, p. 27.

des injections de bacilles humains ou bovins morts réagissent à une inoculation de bacilles aviaires vivants par des lésions beaucoup plus importantes que des cobayes neufs.

Un cas tout à fait comparable aux nôtres est rapporté par E. M. Medlar (9) : cet auteur a vacciné 4 lapins par voie sous-cutanée avec 5 milligrammes de bacilles tuberculeux de type humain (souche H-37). Les animaux reçurent, six mois plus tard, 1 milligramme de bacilles aviaires par voie veineuse. Trois de ces lapins sont morts de cent vingt-deux à cent quarante-neuf jours après l'épreuve, mais un seul est mort après sept jours, présentant une forte tuméfaction de la rate et du foie.

Des réactions hyperergiques furent également observées par R. Bieling et L. Oelrichs (10), quand ils ont surinfecté des lapins, vaccinés avec des bacilles humains morts, introduits par voie intratesticulaire, en leur inoculant 0 milligr. 001 de bacilles bovins dans la veine. Trois animaux moururent respectivement en douze, quinze et dix-sept jours, ce qui, pour une si petite dose, constitue certainement une réaction hyperergique, comme le disent les auteurs ; d'ailleurs, les témoins sont morts bien plus tardivement.

Une expérience du même genre est rapportée par J. Freund et E. L. Opie (11), qui ont vu mourir 2 lapins, fortement allergisés par des injections répétées de bacilles de Koch morts, respectivement un et sept jours après une injection intraveineuse de bacilles morts.

Il est également possible de provoquer de ces réactions rapidement mortelles en infectant des cobayes allergiques par inhalation avec des bacilles tuberculeux virulents. C'est ce qu'ont fait K. A. Jensen et G. Bindsvlev (12). Leurs animaux ainsi traités meurent souvent en quelques jours, ou même le lendemain de l'épreuve virulente, d'une pneumonie tuberculeuse aiguë.

Mais c'est surtout dans une note de A. Boquet et

(9) *Amer. J. Pathol.*, **7**, 1931, p. 475.

(10) *Beitr. z. Klin. d. Tbk.*, **90**, 1937, p. 491.

(11) *J. of Exp. Med.*, **68**, 1938, p. 273.

(12) *Acta Tuberc. Scand.* **11.**, 1937, fasc. 2, p. 101.

W. Schaefer (13) qu'on trouve le plus de cas comparables aux nôtres. Nous les citerons ici brièvement:

Deux lapins reçoivent 1 milligramme de bacilles aviaires par voie sous-cutanée et, un mois plus tard, 0 milligr 2 de la même culture dans la veine ; treize semaines après la première injection, ils sont éprouvés par une inoculation endoveineuse de 1 milligramme d'une culture aviaire : ils meurent respectivement en sept et dix jours. Deux autres lapins sont infectés, par voie sous-cutanée, avec 2 milligrammes de bacilles aviaires ; inoculation veineuse de 1 milligramme de la même culture six semaines plus tard : les deux animaux meurent en neuf jours. Sept lapins reçoivent 0 milligr. 00001 de bacilles bovins et sont éprouvés huit semaines plus tard par voie veineuse, avec 2 milligrammes de bacilles aviaires : 4 meurent après six, sept, neuf, dix jours. Quatre lapins, enfin, sont préparés par une injection intraveineuse de 1 milligramme de bacilles humains atténués et reçoivent, trente-six jours plus tard, 1 milligramme de bacilles aviaires. Deux d'entre eux meurent avant le douzième jour : l'un en huit jours, l'autre en neuf jours.

Nous nous bornons pour le moment à constater, en relisant cette énumération d'observations concernant des cas d'hyperergie expérimentale, que le bacille aviaire y est souvent en jeu.

L'étude expérimentale que nous avons entreprise comprend 8 groupes d'expériences, par lesquelles nous avons voulu essayer le pouvoir allergisant de bacilles aviaires et bovins morts et du BCG vivant vis-à-vis d'une infection d'épreuve sévère par des bacilles vivants, homologues ou non. Nous nous sommes servis de deux souches aviaires (Tr. XII et J.), bien pathogènes, et d'une souche bovine (H.-Sauton), très virulente. Les injections d'épreuve ont toujours eu lieu par voie veineuse, les injections préparantes également, à de rares exceptions près. Les 8 groupes d'expériences comprennent :

1° Des lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par du BCG ;

(13) *C. R. Soc. Biol.*, **117**, 1938, p. 477.

2° Des lapins préparés par des injections répétées de bacilles bovins morts et éprouvés par des bacilles bovins vivants ;

3° Des lapins préparés par des injections répétées de bacilles aviaires morts et éprouvés par des bacilles aviaires vivants ;

4° Des lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par des bacilles aviaires vivants à la dose de 1 milligramme ;

5° Des lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par des bacilles aviaires vivants à la dose de 0 milligr. 1 ;

6° Des lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de 5 milligrammes de BCG ;

7° Des lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de bacilles bovins vivants ;

8° Des lapins préparés par des injections de bacilles bovins morts et éprouvés par une injection de bacilles aviaires vivants.

Voici le détail de ces expériences :

PREMIÈRE EXPÉRIENCE : Lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par du BCG.

Huit lapins reçoivent tous les cinq jours une injection intraveineuse de 1 milligramme de BCG vivant. Deux meurent de maladies intercurrentes au cours du traitement. Six sont inoculés, également par voie veineuse, avec 5 milligrammes de BCG, onze jours après la septième injection préparante. Deux d'entre eux meurent respectivement d'une pasteurellose et d'une pneumococcie dans les deux semaines qui suivent l'épreuve ; les quatre autres survivent sans avoir présenté le moindre phénomène de choc.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE : Lapins préparés par des injections répétées de bacilles bovins morts et éprouvés par des bacilles bovins vivants.

Quatre lapins sont préparés par des injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles bovins morts tous les cinq jours. L'un meurt avant l'épreuve ; les trois autres sont éprouvés onze jours après la cinquième injection de bacilles morts par une injection de 1 milligramme du même bacille bovin vivant, par voie veineuse. Ils sont morts dans les délais habituels d'une granulie intense des poumons.

TROISIÈME EXPÉRIENCE : Lapins préparés par des injections répétées de bacilles aviaires morts et éprouvés par des bacilles aviaires vivants.

Cette série fait partie d'un travail antérieur (14). Sur 13 lapins préparés par une à trois injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles aviaires morts (culture Tr. XII), éprouvés de cinq à trente-cinq jours après la première injection préparante par une inoculation endoveineuse de 0 milligr. 1 de la même culture aviaire vivante, trois

(14) C. R. Soc. Biol., 129, 1938, p. 649.

sont morts respectivement en douze heures, en sept et en neuf jours ; les autres sont morts dans les délais habituels d'une tuberculose « Yersin », sauf trois qui ont survécu respectivement quarante-six, cinquante et un et soixante-huit jours. Les trois animaux morts d'une toxi-infection « Yersin en raccourci », présentèrent à l'autopsie des lésions caractérisées par des congestions intenses du foie et de la rate sans formations nodulaires.

QUATRIÈME EXPÉRIENCE : *Lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par des bacilles aviaires vivants à la dose de 1 milligramme.*

Quatre lapins reçoivent une seule injection sous-cutanée de 2 milligrammes de BCG, et quatre autres lapins sont inoculés tous les cinq jours avec 1 milligramme de BCG, dont trois fois par voie veineuse et deux fois sous la peau de la région inguinale. Ils sont éprouvés, deux mois après le début de cette vaccination, par une injection intraveineuse de 1 milligramme de bacilles aviaires (culture Tr. XII), en même temps que 2 lapins témoins. Ces derniers meurent le douzième jour, alors que, parmi les 8 lapins prémunis, 4 meurent respectivement en quatre, cinq, sept et neuf jours. Ils présentaient à l'autopsie une forte congestion de la rate et du foie, qui contenaient de très nombreux bacilles. C'est donc l'image du « Yersin en raccourci », une fois de plus.

CINQUIÈME EXPÉRIENCE : *Lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par des bacilles aviaires vivants à la dose de 0 milligr. 1.*

Huit lapins, divisés en deux lots de 4, sont préparés par le BCG, de la même manière que ceux de l'expérience précédente. Ils sont éprouvés, en même temps que 2 témoins, par une injection endo-veineuse de 0 milligr. 1 de la même culture aviaire Tr. XII. La dose d'épreuve fut donc dix fois inférieure à celle qui fut injectée dans la série précédente. Tous ces animaux sont morts d'une toxi-infection tuberculeuse « Yersin » dans les délais normaux, sauf un seul, parmi les vaccinés, qui est mort d'une granulie rénale et avec des lésions tuberculeuses osseuses deux mois et demi après l'épreuve. Les ensemencements ont donné dans ce cas une culture composée uniquement de colonies aviaires. Par conséquent, aucun cas de toxi-infection « en raccourci » ne s'est produit dans cette série, à cause sans doute de la dose d'épreuve plus modérée.

SIXIÈME EXPÉRIENCE : *Lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de 5 milligrammes de BCG.*

Huit lapins reçoivent des injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles aviaires morts (culture J.) tous les cinq jours. Deux meurent au cours du traitement d'infections intercurrentes. Six sont éprouvés dix-huit jours après la sixième injection de bacilles morts, par une inoculation endo-veineuse de 5 milligrammes de BCG vivant. Quatre lapins ainsi éprouvés sont morts dans les douze heures qui ont suivi l'injection de BCG. A l'autopsie et à l'examen histologique, on trouva chez tous les quatre de l'œdème hémorragique et de l'infiltration diffuse aux poumons ; le foie est décoloré et présente sur les coupes de la stase veineuse, des plaques hémorragiques, de l'infiltration diffuse et des cellules géantes disséminées. La rate est tuméfiée jusqu'à huit à

douze fois sa taille normale ; elle est hémorragique et présente des plages épithélioïdes et des cellules géantes. Dans les reins, on trouve de la nécrose granuleuse massive des tubes contournés. La formule leucocytaire, établie quatre heures après l'injection d'épreuve, avait montré des pourcentages extrêmement élevés de lymphocytes, jusqu'à 98 p. 100. Les rares granulocytes étaient dégénérés et il y avait absence totale de formes jeunes. Il existait donc une hypogranulocytose très prononcée. La série rouge était caractérisée par de l'anisocytose, de la poikilocytose, de la polychromatophilie et de nombreux normoblastes. Tout ceci semble indiquer une intoxication grave de la moelle osseuse. Enfin, 2 de ces lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par du BCG ont survécu. Ils ont eu des pourcentages de polynucléaires basophiles dépassant 10 p. 100 dans les semaines qui ont suivi immédiatement l'épreuve, puis tout est rentré dans l'ordre. Bien entendu, rien d'anormal ne s'est produit chez 2 lapins témoins, inoculés avec 5 milligrammes de BCG en même temps que les lapins préparés. Les graves lésions trouvées chez les animaux morts de choc sont dues sans aucun doute à leur sensibilisation par les bacilles aviaires morts.

SEPTIÈME EXPÉRIENCE : Lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de bacilles bovins vivants.

Six lapins reçoivent tous les cinq jours une injection intra-veineuse de 1 milligramme de bacilles aviaires morts (culture Tr. XII). Trois meurent d'infections intercurrentes au cours du traitement. Les trois autres sont éprouvés, onze jours après la cinquième injection de bacilles morts, par une inoculation endo-veineuse de 1 milligramme de bacilles bovins vivants. L'un meurt trois jours plus tard ; l'autopsie révèle, comme signes les plus saillants, une alvéolite et de l'œdème alvéolaire aux poumons et une infiltration diffuse abondante, à prédominance polynucléaire, du foie. On ne trouve pas de bacilles acido-résistants, ni aucun autre microbe. Les deux autres lapins meurent respectivement en vingt-cinq et vingt-six jours d'une granulie intense des poumons.

HUITIÈME EXPÉRIENCE : Lapins préparés par des injections de bacilles bovins morts et éprouvés par une injection de bacilles aviaires vivants.

Huit lapins reçoivent des injections répétées tous les cinq jours de 1 milligramme de bacilles bovins morts. Quatre meurent au cours du traitement d'autres maladies. Les 4 survivants sont éprouvés, onze jours après la cinquième injection de bacilles morts, par une inoculation de 1 milligramme de bacilles aviaires vivants (culture Tr. XII) par voie veineuse. L'un meurt dans les douze heures qui suivent l'épreuve, présentant à l'autopsie une congestion intense des organes, et à l'examen histologique une bronchi-alvéolite et des placards épithélioïdes aux poumons, une prolifération réticulaire et plasmodiale au foie et des nappes épithélioïdes dans la rate. Un deuxième meurt en huit jours, présentant des lésions analogues à celles du précédent. Un troisième meurt d'une pneumonie après deux mois, et le quatrième vit encore (15).

(15) Nous remercions M. BABLET, qui a bien voulu nous aider de ses conseils dans l'interprétation des coupes.

DISCUSSION.

Le premier fait qui se dégage de cette série d'expériences concerne le BCG : il semble évident que des lapins, traités par plusieurs injections intraveineuses de BCG, ne présentent aucune réaction d'hyperergie quand on leur inocule, également par voie veineuse, une dose massive de 5 milligrammes de BCG six à sept semaines après le début de la prémunition.

Mais il y a un autre fait à relever dans ces différentes expériences, c'est que des cas de réaction hyperergique, ce que nous avons appelé des toxi-infections Yersin « en raccourci », ou même des cas de choc (mort en moins de douze heures), se sont produits seulement dans celles de nos expériences où le bacille aviaire est intervenu soit à l'état mort, dans la préparation des animaux, soit vivant comme infection d'épreuve et à dose suffisante, donc dans les expériences 3, 4, 6, 7 et 8.

Nous répétons à ce propos ce que nous venons de dire plus haut : en relisant les observations d'hyperergie expérimentale que nous avons trouvées dans la littérature, on constate que le bacille aviaire y est souvent en jeu. Il en est donc de même dans nos expériences personnelles.

Ainsi, les lapins préparés par des injections répétées de bacilles bovins morts et éprouvés par l'inoculation de 1 milligramme de bacilles bovins vivants, n'ont pas eu de réactions d'hyperergie et sont morts, dans des délais normaux, de granulie pulmonaire. Il est possible que des doses d'épreuve plus fortes eussent déclenché une mort précoce chez quelques-uns de ces animaux ; nous avons voulu nous tenir dans les mêmes conditions pour le bacille bovin que pour le bacille aviaire et ne pas dépasser la dose de 1 milligramme. D'ailleurs, comme nous l'avons déjà indiqué plus haut, la souche bovine dont nous nous sommes servis est très virulente.

Dans ces conditions, il semble ressortir de nos expériences que certaines souches de bacilles aviaires sont douées d'une « toxicité » plus grande pour le lapin que certains bacilles bovins. Nous nous rendons compte que le mot « toxicité » est impropre à désigner l'action nocive dont il est question, puisqu'il ne saurait s'agir de la production d'une toxine dans

le cas du bacille tuberculeux comme dans celui du bacille de Loeffler par exemple. C'est pourquoi nous le mettons entre guillemets, faute de mieux.

Nous avons insisté, à différentes reprises, sur ce caractère « toxique » du bacille aviaire pour le lapin et nous avons cru pouvoir distinguer dans ce bacille deux facteurs de pathogénécité : un facteur « virulence » proprement dite, et un facteur « toxicité ». En effet, quand on pratique l'autopsie d'un lapin mort d'une tuberculose du type Yersin à la suite de l'inoculation intraveineuse d'une dose suffisante de bacilles aviaires, on est frappé, dans la grande majorité des cas, par l'absence de lésions nodulaires visibles à l'œil nu et, sur les coupes, les nodules sont souvent rares et les lésions ont plutôt un caractère inflammatoire ou toxique banal. Nous avons attribué ces dernières lésions au facteur « toxique » agissant dans un organisme devenu allergique, et les lésions spécifiques nodulaires plus rares au facteur « virulence », en nous rendant compte, bien entendu, de tout ce que cette distinction pouvait avoir d'arbitraire et de schématique.

Rappelons à ce sujet les injections répétées de bacilles aviaires morts, auxquelles nous avons soumis des lapins (16) : les animaux ainsi traités sont sensibilisés à tel point que la dernière injection (souvent la huitième) déclenche la mort. Les lésions trouvées à l'autopsie ressemblent d'une manière frappante à celles qu'on note chez les lapins morts de tuberculose « Yersin ». Les lésions histologiques s'en distinguent par l'absence de formations folliculaires, mais le caractère congestif et hémorragique des lésions et les infiltrations intenses sont tout à fait comparables à ce qu'on trouve dans la toxi-infection « Yersin ».

Ce sont donc ces lésions non folliculaires, non spécifiques, causées par le bacille aviaire mort autant que par le bacille aviaire vivant, que nous croyons pouvoir attribuer au facteur « toxique » de ce bacille.

Or, en examinant les images histologiques sur les coupes provenant des lapins morts de tuberculose Yersin « en raccourci », dans les expériences relatées dans le présent mémoire,

(16) *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1933, p. 1063.

on retrouve ces mêmes lésions inflammatoires, ces infiltrations diffuses à polynucléaires, ces plages épithélioïdes parsemées de cellules géantes, et même ces dégénérescences des tubes contournés dans le rein dans certains cas, que nous avons déjà notées chez des lapins morts de tuberculose Yersin à bacilles aviaires vivants, ou morts à la suite d'injections répétées de bacilles aviaires morts.

Nous rappelons la fréquence relative d'une augmentation du pourcentage des polynucléaires basophiles que nous avons trouvée, avec J. Solomidès, chez des lapins inoculés avec des bacilles aviaires, soit directement, soit après un traitement préalable par des bacilles aviaires morts (17). Nous avons rapproché cette basophilie de celle qu'on peut provoquer artificiellement chez le lapin par des intoxications expérimentales (Levaditi, Pröscher, Nicolau). On est tenté d'y voir, par conséquent, un signe de plus de la « toxicité » des bacilles aviaires.

L'hypogranulocytose extrême et les images « toxiques » de la série rouge du sang chez les lapins de l'expérience n° 6 plaident également en faveur d'un véritable empoisonnement, comme le font d'ailleurs les nécroses granulaires des tubes contournés des reins chez ces mêmes lapins.

On sait, d'autre part, qu'il existe des arthropathies chez le lapin, causées par le bacille aviaire (18). Or, ces animaux n'hébergent plus de bacilles, la plupart du temps, que dans les abcès qui entourent les articulations malades. Néanmoins, ils finissent par mourir cachectiques. On a l'impression que les bacilles, pourtant cantonnés dans quelques foyers seulement, loin des organes vitaux, réussissent à empoisonner l'organisme tout entier.

Comment s'expliquer cette action nocive du bacille aviaire quand, d'autre part, la tuberculine, produite dans les cultures de ce germe sur milieux liquides, est justement douée de qualités réactionnelles assez médiocres ?

Nous croyons que Straus et Gamaleia ont touché le nœud du problème en disant que « ce n'est pas dans le milieu de culture où ce bacille a végété que l'on retrouve les principaux

(17) *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 828.

(18) Voir la littérature sur ce sujet, in *Rev. de la Tuberc.*, **5**, février 1939, p. 242.

produits toxiques qu'il élabore. Ces substances sont fixées et retenues dans le corps même du bacille. » (19).

A. Calmette décrit, lui aussi, les substances toxiques, « intimement liées au protoplasma » des bacilles tuberculeux (20).

On sait que seules les fractions protéiques des bacilles tuberculeux suffisamment complexes sont allergisantes et toxiques pour l'animal neuf. Les fractions par trop dénaturées par les manipulations physico-chimiques ne sont plus toxiques pour l'animal sain, et beaucoup moins toxiques pour l'animal tuberculeux. C'est ainsi que la tuberculine est trop dénaturée pour être antigène (21).

Il est donc possible que les corps bacillaires, dans le cas de certaines cultures aviaires, soient plus « toxiques » que ceux du bacille de type bovin, tout en produisant dans les cultures une tuberculine plus dénaturée et, partant, moins active que celle des autres types bacillaires.

CONCLUSION.

Nous pensons que certaines cultures de bacilles tuberculeux du type aviaire ont un pouvoir « toxique » plus prononcé que des cultures de bacilles des mammifères, malgré la moindre activité de leur tuberculine, et nous tenons le lapin allergisé pour particulièrement sensible aux poisons que constituent les protéines des corps bacillaires aviaires.

Quant au BCG, il nous a été impossible de provoquer un état de choc ou d'hyperergie mortels chez des lapins traités par des injections répétées de BCG et éprouvés quelque temps après par une injection intraveineuse massive de ce même germe.

(19) *Arch. de Méd. Exp.*, 3, 1891, p. 705.

(20) *L'Infection bacillaire et la Tuberculose*, 4^e éd., 1936, p. 199.

(21) J. ALBERT-WEIL. *Les poisons du bacille tuberculeux*, etc., Paris, 1931.

INFLUENCE DES CAROTÉNOÏDES SUR LA CROISSANCE ET L'ACIDO-RÉSISTANCE DES BACILLES PARATUBERCULEUX DE LA FLÉOLE

par E. DARZINS.

(Institut d'Hygiène de l'Université de Riga, Lettonie.

Directeur : Professeur E. FEHRMANN.)

I. — ANALOGIE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES TERPÈNES ET DES CAROTÉNOÏDES.

Dans des recherches précédentes (1), nous avons démontré que l'huile de pin exerce *in vitro* et *in vivo* une action d'inhibition sur la croissance des bacilles tuberculeux et paratuberculeux. L'examen comparé de plusieurs dérivés de l'huile de pin a révélé que l'effet de cette substance sur les bactéries dépend de sa teneur en terpinéol, qui en constitue de 60 à 90 p. 100, et en composés encore mal définis, dont le taux dans l'huile de pin lettone atteint 25 p. 100. Enfin, l'étude parallèle de différents terpènes a mis en évidence que l'action du terpinéol sur les bacilles tuberculeux est nettement en relation avec la présence d'un noyau avec liaison double dans la molécule.

Or, Willstätter et Mieg ont déjà signalé la similitude de la structure chimique des terpènes et des caroténoïdes. Actuellement, les terpènes, ainsi que les caroténoïdes, sont considérés comme des produits de polymérisation de l'isoprène. En tenant compte de cette analogie de leur structure chimique, nous avons supposé qu'il existe une analogie dans l'action biologique de ces deux groupes de substances. En conséquence, nous avons examiné l'effet des caroténoïdes sur la croissance de bacilles acido-résistants.

(1) DARZINS (E.). Ces *Annales*, **61**, 1938, p. 172.

II. — PIGMENTS DU BACILLE DE LA FLÉOLE ET DU JAUNE D'ŒUF. LEUR EFFET SUR LA CROISSANCE DU BACILLE DE LA FLÉOLE.

A. Boquet a étudié les conditions optima de la formation de ces substances par le bacille de Grassberger en fonction de la température. Chargaff et Lederer, Ingraham et Steenbock et d'autres auteurs ont mis en évidence la présence des caroténoïdes dans les bacilles acido-résistants. D'après Chargaff, le β -carotène constitue la partie principale du pigment dans le bacille de la fléole. Cependant, le rôle de ce pigment dans le métabolisme bactérien est inconnu. On a supposé que les caroténoïdes jouent un rôle dans la fonction respiratoire de bactéries, comme la pyocyanine, dont la fonction a été étudiée par Michaelis et Friedheim.

Le pigment jaune rougeâtre du bacille de la fléole est inclus dans les corps mêmes des germes. Il se forme dans les cultures à la température du laboratoire, tandis qu'à la température de 37° à l'étuve, les cultures sont incolores. La présence d'huile d'olive dans le milieu de culture favorise la formation du pigment par le bacille de la fléole, tandis que les vapeurs d'huile de pin empêchent cette formation. Il est possible d'isoler le pigment par l'extraction de bacilles avec l'alcool, le chloroforme et les huiles (huile de vaseline, huile de pin, etc.).

Nous avons envisagé l'action d'un autre pigment sur les cultures de bacilles acido-résistants, notamment du pigment du jaune d'œuf, qui constitue la partie essentielle de certains milieux nutritifs, tels que les milieux de Dorset, de Petroff, de Besredka et de Loewenstein. Il nous a paru intéressant, avant d'étudier l'action du pigment propre de bacilles acido-résistants, d'examiner l'influence d'un pigment caroténoïde sur la croissance et l'acido-résistance de ces bacilles, ainsi que sur la formation de leur propre pigment. Pour isoler le pigment de l'œuf, nous avons traité le jaune d'œuf par l'acétone, ce qui nous a permis d'obtenir, après évaporation, une substance huileuse renfermant les caroténoïdes (xanthophylle).

Nous avons ajouté cet extrait, à raison de 0,01 p. 100, à de la gélose glycinée. Ce milieu présente à peu près le même

pH que la gélose sans extrait. Cependant, les cultures du bacille de la fléole obtenues sur la gélose additionnée de l'extrait du jaune d'œuf sont moins abondantes que les cultures sur le même milieu sans extrait. Cet extrait exerce donc une certaine action d'inhibition sur la croissance du bacille de la fléole.

III. — MÉTHODE D'EXAMEN DE L'ACIDO-RÉSISTANCE.

Dans nos expériences préliminaires, nous avons constaté que, pour étudier comparativement l'acido-résistance de germes sur divers milieux, il faut comparer les zones correspondantes des colonies développées sur ces milieux, car, dans chaque colonie, la zone centrale est plus riche que la zone périphérique en germes acido-résistants. Pour cette raison, les cultures diffuses sur les milieux solides ne peuvent pas servir pour étudier les caractères tinctoriaux des germes. Afin d'éviter les variations dues à la technique, nous avons préparé sur la même lamelle les frottis d'une culture sur le milieu examiné et les frottis d'une culture témoin sur le milieu ordinaire, ce qui permet de colorer les deux frottis exactement avec la même technique.

Les frottis des colonies obtenues sur le milieu renfermant de l'huile furent immergés dans un bain de benzène (cinq minutes) avant la coloration.

Les frottis sur la lamelle furent colorés par la fuchsine de Ziehl à 60° pendant une minute. Les frottis colorés furent immergés dans un bain de sulfite de soude à 1 p. 100 pour obtenir une décoloration régulière.

En opérant dans ces conditions, nous avons pu constater que les cultures du bacille de la fléole sur gélose glycinée et additionnée d'extrait de jaune d'œuf se montrent intensément colorées en rouge, même quarante-huit heures après l'application du traitement décolorant, tandis que les germes développés sur la gélose glycinée pure sont entièrement décolorés par le même procédé.

IV. — INFLUENCE DU CAROTÈNE CRISTALLISÉ
SUR LA CROISSANCE ET L'ACIDO-RÉSISTANCE DE BACTÉRIES.

Pour élucider le rôle du pigment contenu dans l'extrait de jaune d'œuf, nous avons étudié l'influence du carotène cristallisé (β -carotène cristallisé Hoffmann-La Roche) sur les cultures du bacille de la fléole et du bacille tuberculeux. Le carotène fut dissous dans de l'huile de vaseline ou dans de l'huile d'olive, ou encore agité dans de l'eau et stérilisé par chauffage trois jours successifs à 75°, pendant trente minutes. La gélose glycinée, additionnée d'une certaine dose de carotène, fut placée dans des tubes (gélose inclinée) ou des boîtes de Petri, puisensemencée abondamment en certains points. Nous avons constaté que l'ensemencement du bacille de la fléole sur 10 c. c. de gélose additionnée de 0 gr. 002 de carotène ne donne presque aucune végétation, tandis que l'ensemencement analogue sur le même milieu sans carotène aboutit à une croissance abondante. Ces résultats montrent nettement que le carotène ajouté au milieu nutritif exerce une action d'inhibition sur la croissance du bacille de la fléole.

En examinant comparativement par les méthodes ci-dessus décrites l'acido-résistance, nous avons trouvé que les germes obtenus sur le milieu avec carotène conservent leur coloration même après quatre-vingt-seize heures de traitement par une solution à 1 p. 100 de sulfite de soude, tandis que les germes cultivés sur les milieux témoins (sans carotène) sont complètement décolorés dans la même solution après vingt-quatre heures.

Étant donné cette augmentation de l'acido-résistance par le carotène, il apparaît donc, *a priori*, que, dans les cultures du bacille de la fléole sur le milieu ordinaire à la température du laboratoire, fortement pigmentées (réaction nettement positive de Carr-Price pour les substances caroténoïdes), les germes doivent être plus acido-résistants que dans les cultures à 37°, qui sont relativement pauvres en pigment (réaction de Carr-Price négative ou douteuse). Cette supposition est confirmée par l'expérience : en effet, dans les cultures du bacille de la fléole obtenues à la température du laboratoire, les germes

colorés par la méthode de Ziehl restent colorés après le traitement pendant vingt-quatre heures par le sulfite de soude, tandis que le même traitement décolore les mêmes germes provenant de cultures à 37°.

Le raisonnement inverse impose, *a priori*, une autre supposition : il est probable que le traitement des cultures du bacille de la fléole par une méthode déterminant la diminution de leur teneur en pigment ou la disparition totale de celui-ci contribue également à diminuer ou à faire disparaître leur acido-résistance. En effet, déjà Isabolinski et Gitowitsch ont signalé que, dans les cultures du bacille tuberculeux sur gélose glycinée, placée sous une couche d'huile d'olive, les germes perdent graduellement leur acido-résistance. Contrairement à l'avis de ces auteurs, l'action de l'huile n'est pas spécifique, car des résultats analogues sont obtenus avec l'huile de vaseline. Dans nos recherches personnelles, nous avons observé que déjà après trois passages dans les cultures sous huile de vaseline, les bacilles de la fléole perdent leur pigment et leur acido-résistance et que les cultures changent également d'aspect : celles-ci ne forment plus une masse sèche et pigmentée, mais une membrane transparente semblable à une culture de *B. coli*. Les bacilles de cette culture colorés par la méthode de Ziehl sont décolorés par le sulfite de soude en dix minutes, c'est-à-dire aussi rapidement que le *B. coli* ou le *B. subtilis*. Cette modification du bacille de la fléole produite dans les cultures sous l'huile est facilement réversible. En effet, après quelques passages sur gélose sans huile, les cultures anormales récupèrent leur pigment et leur acido-résistance.

V. — MÉCANISME D'ACTION DU CAROTÈNE SUR LES BACTÉRIES ACIDO-RÉSISTANTES.

Pour interpréter l'effet du carotène sur la croissance et l'acido-résistance des bacilles, nous avons d'abord tenu compte de la coloration jaune intense des colonies du bacille de la fléole, cultivé à 37° sur des milieux avec carotène (les témoins cultivés à 37° sur des milieux sans carotène sont incolores). Nous avons supposé que cette coloration des colonies et l'augmentation de l'acido-résistance des bacilles développés sur

les milieux riches en carotène seraient dues à une combinaison chimique entre le carotène et les graisses ou les acides gras du bacille. Cependant, cette hypothèse ne fut pas confirmée par nos expériences : le carotène additionné à différentes températures aux graisses et aux acides gras, saturés ou non saturés, n'a pas changé l'acido-résistance de ces substances. De même, l'addition de carotène n'a pas augmenté l'acido-résistance des produits extraits du bacille de la fléole par l'éther de pétrole. Ces résultats négatifs nous permettent de supposer que le carotène agit seulement dans la cellule vivante pour produire l'accumulation de substances acido-résistantes et entraver la croissance des germes : les bacilles morts immergés dans la solution de carotène n'augmentent pas l'acido-résistance.

Comme nous l'avons démontré (2), l'augmentation de l'acido-résistance des bacilles paratuberculeux est due à l'élévation du point de fusion de leurs substances grasses. Cette élévation entraîne une plus grande résistance de ces bacilles contre la chaleur, acides et alcalis dilués.

CONCLUSIONS.

1° Les substances caroténoïdes et le carotène cristallisé entravent la végétation du bacille de la fléole.

2° Les bacilles de la fléole développés sur la gélose glycerinée additionnée de carotène se montrent plus acido-résistants que les bacilles provenant d'une culture sur la gélose sans carotène.

3° L'accroissement de la teneur des bactéries en carotène détermine une augmentation de leur acido-résistance, et, réciproquement, la disparition progressive de leur pigment entraîne l'atténuation progressive de leur acido-résistance.

4° L'augmentation de l'acido-résistance des bacilles paratuberculeux est due à l'élévation du point de fusion de leurs substances grasses. Cette augmentation confère à ces bacilles une résistance plus grande contre la chaleur, les acides et les alcalis dilués.

(2) DARZINS (E.). Ces *Annales*, 49, 1932, p. 743.

5° Le carotène n'est pas un constituant indispensable à la vie des bacilles acido-résistants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOQUET (A.). Article Bacilles paratuberculeux in *Traité de Bactériologie*, publié par Nattan-Larrier.
- [2] DARZINS (E.). Ces *Annales*, **61**, 1938, p. 172.
- [3] DARZINS (E.). Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 743.
- [4] CHARGAFF (E.) et LEDERER (E.). Ces *Annales*, **54**, 1935, p. 393.
- [5] INGRAHAM (M. A.) et STEENBOCK (H.). *Biochem. Journ.*, **29**, 1935, p. 2553.
- [6] ISABOLINSKY (M.) et GITOWITSCH (W.). *Zeits. f. Immun.*, **40**, 1924, p. 303.
- [7] MAC JUNKIN (F. A.). *Amer. Rev. Tubercul.*, **9**, 1924, p. 464.
- [8] WILLSTATTER (R.) et MIEG (W.). *Liebig's Ann.*, **19**, 1907, p. 355.

**ACTION DE L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE
DU B. DE SHIGA
SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE
DU SÉRUM FRAIS NORMAL DE LAPIN**

par P. THIBAUT.]

(*Institut Pasteur. Service de M. le docteur DUMAS.*)

On sait que le polysaccharide spécifique d'un type de pneumocoque, ajouté dans des mélanges de sérum et de leucocytes, s'oppose spécifiquement à la phagocytose des pneumocoques du même type.

Ce fait a été établi par Sia[1], et confirmé par H. K. Ward [2] qui a montré, en outre, que l'action inhibitrice du polysaccharide peut être neutralisée par un immun-sérum. Mais cet immun-sérum doit être convenablement dilué : si la quantité d'anticorps est trop faible; l'action inhibitrice n'est pas neutralisée ; si la quantité d'anticorps est trop forte, la phagocytose ne se produit pas non plus. Ward attribue ce phénomène paradoxal à l'action, « peut-être mécanique », du précipité spécifique sur les leucocytes.

Il nous a paru intéressant d'entreprendre une étude comparable avec un microbe tel que le B. dysentérique de Shiga, dont la sensibilité, bien connue, au sérum frais normal, permet de mettre hors de cause le rôle des leucocytes dans les phénomènes observés.

De ce bacille, comme de nombreux autres microbes qui ne restent pas colorés après la méthode de Gram, A. Boivin et ses collaborateurs [3] ont pu extraire un complexe glucido-lipidique spécifique. Ce complexe a, non seulement, comme un haptène, la propriété de donner, *in vitro*, des réactions immunologiques, mais il se comporte aussi comme un antigène : son injection à l'animal provoque la formation d'anticorps O dont Félix et Olitzki [4] ont montré l'importance dans la bactériolyse.

C'est avec l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga que nous avons recherché et étudié l'inhibition du pouvoir bactéricide du sang et du sérum frais normal de lapin.

I. — Technique.

La technique suivie pour ces expériences est inspirée de celle de H. K. Ward [2].

SANG. — Le sang est recueilli stérilement par ponction cardiaque de lapins neufs. Il est défibriné doucement, dans un ballon contenant des perles de verre, et utilisé le jour même, ou, exceptionnellement, conservé à la glacière jusqu'au lendemain. Le sérum est obtenu en centrifugeant le sang défibriné ou en laissant le sang coaguler dans des godets et en centrifugeant au moment de l'emploi.

ANTIGÈNE. — Trois préparations d'antigène glucido-lipidique sont utilisées pour ces expériences. Elles ont été obtenues de souches lisses de B. de Shiga, en suivant la technique de A. Boivin, à l'acide trichloracétique. M. A. Boivin a bien voulu les titrer pondéralement. Elles sont rendues isotoniques par addition d'eau salée.

SOUCHES DE B. DE SHIGA. — Les souches de B. de Shiga sont trois souches lisses : Sh. 18 S, Sh. 33 S, Sh. Bucarest S ; trois souches rugueuses : Sh. 18 R, Sh. 30 R, Sh. Bucarest R. Nous classons les souches 18, 33, 30 dans les variantes S ou R d'après leurs propriétés antigéniques. Les souches Bucarest nous ont été confiées par M. A. Boivin : seule la souche S contient un antigène complet glucido-lipidique. Au cours des expériences, la stabilité des variantes est vérifiée grâce à la réaction de Millon [5].

SUSPENSIONS MICROBIENNES. — Les suspensions microbiennes sont faites dans du bouillon dilué au 1/20 avec de l'eau physiologique [6]. Au moment de l'emploi, on émulsionne dans 10 cent cubes la totalité des bacilles développés en dix-huit

heures à 37° sur une gélose inclinée ; on dilue cette suspension au 1/10, au 1/100, au 1/1.000, etc..., jusqu'au 1/10.000.000.

Pour démontrer les germes vivants, 1 goutte de chacune des trois suspensions microbiennes les plus faibles est mélangée à de la gélose liquéfiée et ramenée à 45-50°. Les géloses solidifiées restent pendant quarante-huit heures à l'étuve. Les colonies sont alors comptées : les chiffres donnés dans les expériences représentent la moyenne des nombres fournis par ces trois numérations.

DISPOSITION DE L'EXPÉRIENCE — De petits tubes (diamètre : 1 centimètre, hauteur : 9 centimètres), rangés par séries de 8 reçoivent : 1° une quantité fixe (0 c. c. 5 en général) de sang normal défibriné ou de sérum frais de lapin ; 2° sous un volume aussi petit que possible, les substances dont l'action sur le pouvoir bactéricide est étudiée ; 3° 1 goutte de chacune des suspensions microbiennes. Le premier tube, par exemple, reçoit : 6 bacilles, le deuxième : 60, etc..., le huitième : 60 millions.

On scelle et on porte à l'étuve. La température est de 33°.

Pour assurer un meilleur contact des différents constituants du mélange, les tubes sont soumis pendant le séjour à l'étuve à une rotation lente. Pour cela, nous utilisons un appareil construit sur les indications de notre collègue G. Hornus (1). Une boîte tournant autour d'un axe est reliée à un petit moteur électrique par l'intermédiaire d'un réducteur de vitesse. Les tubes sont couchés et alignés dans la boîte, leur grand axe perpendiculaire à l'axe de rotation, puis ils sont calés avec du coton.

RÉSULTATS. — L'action bactéricide s'exerce rapidement, puis les bacilles qui n'ont pas été détruits se multiplient. Le lendemain, chaque tube est ouvert, une anse du contenu est prélevée et étalée à la surface d'un tube de gélose inclinée. Les géloses sont placées à l'étuve et les résultats lus après vingt-quatre heures. Dans les tableaux, nous exprimons par les signes :

(1) Nous remercions M. G. Hornus d'avoir amicalement mis cet appareil à notre disposition.

- +++ , une culture à colonies confluentes ;
- ++ , une culture moins abondante avec des colonies isolées ;
- + , quelques colonies facilement numérables. Ce signe est habituellement suivi d'un chiffre qui indique le nombre des colonies ;
- , pas de culture.

II — Action de l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga sur le pouvoir bactéricide du sérum normal pour le B. de Shiga.

A. POUVOIR BACTÉRICIDE DU SANG DÉFIBRINÉ ET DU SÉRUM FRAIS NORMAL DE LAPIN POUR LE B. DE SHIGA. — Nous devons, avant toute autre expérience, étudier rapidement le pouvoir bactéricide normal du sang défibriné et du sérum frais de lapin pour le B. de Shiga.

Nous recueillons séparément le sang défibriné et le sérum frais de 4 lapins normaux, de l'un ou l'autre sexe, choisis, à dessein, d'âge et de poids différents ; nous préparons 8 séries de petits tubes, soit 2 séries par lapin. Les tubes de la première contiennent chacun 0 c. c. 5 de sang défibriné ; ceux de la deuxième, 0 c. c. 5 de sérum frais. Chaque tube de même sang estensemencé avec 1 goutte de la même émulsion de B. de Shiga S. Les tubes n° 1 reçoivent 5 bacilles, les tubes n° 2 en reçoivent 50, etc... Les résultats sont notés dans le tableau I.

Le sang des lapins possède un pouvoir bactéricide élevé pour le B. de Shiga. Une moyenne, portant sur une vingtaine d'expériences, montre que 0 c. c. 5 de sang peut détruire 75.000 bacilles. L'amplitude des variations individuelles est très modérée. De même, l'action du sérum est assez constante. On remarque qu'elle est nettement supérieure à celle du sang. Un semblable phénomène a déjà été observé par Mackie, Finkelstein et Van Rooyen (1932) [7] pour les b. dysentériques ainsi que par Fiessinger et Cattani (1928) [8] pour le b. typhique. Sans doute est-il dû à l'action protectrice pour les microbes que peuvent exercer les phagocytes (Rous et Jones, 1916) [9].

Le pouvoir bactéricide du sérum disparaît par chauffage

TABLEAU I. — Pouvoir bactéricide du sang défibriné et du sérum frais pour le B. de Shiga.

NUMÉROS DES TUBES	NOMBRE DE B. DE SHIGA (souche 18 S)	SÉRIES							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		Lapin A		Lapin B		Lapin C		Lapin D	
		Sang : 0 c. c. 5	Sérum : 0 c. c. 5	Sang : 0 c. c. 5	Sérum : 0 c. c. 5	Sang : 0 c. c. 5	Sérum : 0 c. c. 5	Sang : 0 c. c. 5	Sérum : 0 c. c. 5
1	5	—	—	—	—	—	—	—	—
2	50	—	—	—	—	—	—	—	—
3	100	—	—	—	—	—	—	—	—
4	5.000	—	—	—	—	—	—	—	—
5	50.000	—	—	—	—	—	—	—	—
6	500.000	+ 30	—	+ 8	—	—	—	—	—
7	5.000.000	+++	+++	+++	—	+++	—	+++	+
8	50.000.000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Lapin A, femelle, 3.650 grammes; lapin B, mâle, 2.400 grammes; lapin C, mâle, 1.900 grammes; lapin D, mâle, 1.650 grammes.

à 56° pendant trente minutes mais reparait après adjonction d'une faible quantité de sérum frais. La quantité de sérum frais nécessaire pour réactiver 0 c. c. 5 de sérum chauffé est de l'ordre de 0 c. c. 05 à 0 c. c. 1.

En résumé : normalement, le sang défibriné et le sérum frais de lapin sont bactéricides pour le B. de Shiga. Cette propriété est indépendante de l'action des éléments figurés puisque le sérum possède un pouvoir semblable et même supérieur à celui du sang.

La destruction de l'alexine entraîne la disparition de l'action bactéricide du sérum, mais cette propriété reparait dans le sérum chauffé après l'adjonction d'une faible quantité de sérum frais.

B. INHIBITION, PAR L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE DU B. DE SHIGA, DU POUVOIR BACTÉRICIDE DU SANG ET DU SÉRUM FRAIS POUR LE B. DE SHIGA. — Lorsqu'on ajoute à du sang défibriné de

lapin normal une certaine quantité d'antigène glucido-lipidique, extrait d'une souche lisse de B. de Shiga, on diminue le pouvoir bactéricide de ce sang pour une souche lisse de B. de Shiga.

Par exemple (tableau II) 1/2 cent. cube de sang détruit 80 000 B. de Shiga mais, si l'on a ajouté avant l'ensemence-

TABLEAU II. — Action de l'antigène glucido-lipidique sur le pouvoir bactéricide du sang et du sérum frais.

NOMBRE DE B. DE SHIGA (souche 488)	SÉRIES						SÉRIES				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Sang défibriné frais : 0 c.c. 5						Sérum frais : 0 c.c. 5				
	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga										
	0	0 milligr. 033	0 milligr. 016	0 milligr. 008	0 milligr. 004	0 milligr. 002	0	0 milligr. 036	0 milligr. 033	0 milligr. 016	0 milligr. 008
8	—	+++	+++	—	—	—	—	++	++	—	—
80	—	+++	+++	—	—	—	—	+++	++	—	—
800	—	+++	+++	++	—	—	—	+++	++	++	—
8.000	—	+++	+++	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	—
80.000	—	+++	+++	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	++ 14
800.000	+ 3	+++	+++	+++	+++	++	—	+++	+++	+++	+++
8.000.000	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
80.000.000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 6.

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 6.

ment 0 milligr. 004 d'antigène, il ne détruit plus que 800 bacilles ; si l'on a ajouté 0 milligr. 016, il devient incapable de détruire même 8 bacilles.

Avec le sérum, on obtient, de même, l'inhibition complète du pouvoir bactéricide pour le B. de Shiga mais, à volume égal, il faut davantage d'antigène : 0 milligr. 033 dans cette expérience. La quantité de complexe glucido-lipidique nécessaire pour produire l'inhibition semble en rapport avec la quantité de sérum.

TABLEAU III bis.

NOMBRE de B. de Shiga 18S	POUVOIR BACTÉRICIDE DES SÉRUMS			
	39	40	41	42
	Sérum : 0 c.c. 5	Sérum : 0 c.c. 5	Sérum : 0 c.c. 5	Sérum : 0 c.c. 5
80.000	—	—	—	—
800.000	—	—	—	—
8.000.000	—	+ 1	—	+ 4
80.000.000	+++	+++	+++	+++

tions individuelles sont plus importantes que ne le fait supposer cette expérience.

Non seulement la quantité d'antigène nécessaire est variable d'un lapin à l'autre, mais encore elle varie dans le temps pour le même individu. Saignons, en effet, les mêmes animaux quinze jours plus tard et faisons une expérience aussi semblable que possible à la précédente (tableaux IV et IV bis).

Pour 2 lapins, la quantité de complexe glucido-lipidique

TABLEAU IV. — Quantité d'antigène glucido-lipidique nécessaire pour provoquer l'inhibition.

QUANTITÉ d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme	SÉRIES			
	1	2	3	4
	Sérum frais : 0 c.c. 5			
	Lapin 39	Lapin 40	Lapin 41	Lapin 42
	B. de Shiga : 18S Numération : 60 bacilles			
0	—	—	—	—
0,00625	—	—	+++	—
0,0125	—	—	+++	—
0,025	—	—	+++	—
0,05	—	—	+++	—
0,1	—	—	+++	—
0,2	+ 6	—	+++	—
Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.				

TABLEAU IV bis.

NOMBRE de B. de Shiga 18 S	POUVOIR BACTÉRICIDE DES SÉRUMS			
	39	40	41	42
	Sérum : 0 c. c. 5	Sérum : 0 c. c. 5	Sérum : 0 c. c. 5	Sérum : 0 c. c. 5
60.000	—	—	—	—
600.000	—	+ 3	+ 4	—
6.000.000	++	+ 3	++	++
60.000.000	+++	+++	+++	+++

nécessaire pour neutraliser l'effet bactéricide de 0 c. c. 5 de sérum est supérieure à 0 milligr. 2 ; pour le lapin n° 41, elle est inférieure à 0 milligr. 00625 : quantité exceptionnellement faible.

Il ne semble pas que la répétition de la saignée soit à incriminer puisque la dose nécessaire d'antigène augmente pour 3 lapins et diminue pour le quatrième.

Enfin, l'intensité du pouvoir bactéricide et la quantité du complexe susceptible de le neutraliser ne paraissent pas en rapport étroit : leurs variations ne sont pas forcément parallèles. Par exemple, le sérum du lapin n° 40 manifeste sensiblement la même activité dans les deux expériences, bien que la quantité d'antigène nécessaire pour produire l'inhibition ait augmenté de 0 milligr. 025 à plus de 0 milligr. 2.

D. LA TENEUR EN ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE DE DIVERSES SOUCHES DE B. DE SHIGA MODIFIE-T-ELLE LEUR SENSIBILITÉ AU SÉRUM ? — Puisque le complexe glucido-lipidique produit une inhibition du pouvoir bactéricide du sérum, il serait raisonnable de penser que les diverses souches de B. de Shiga sont plus ou moins sensibles selon leur teneur en antigène.

A. Boivin et L. Mesrobian ont montré que les variantes « S » fournissent seules ce complexe et que les variantes « R » en sont dépourvues [10]. Bordet et Renaux [11] ont déjà observé une plus grande sensibilité à l'alexine de la variante R du *B. coli* Mackie et Finkelstein [12] ont fait une remarque

identique pour le B. typhique mais n'ont pas trouvé de différence entre les deux variantes du B. de Shiga.

Dans les expériences que nous rapportons, les bacilles de Shiga, qu'ils appartiennent à des souches S ou à des souches R, présentent à peu près la même sensibilité au pouvoir bactéricide du sérum normal.

TABLEAU V. — **Pouvoir bactéricide du sérum frais pour les bacilles de Shiga S ou R.**

SÉRIES							
1		2		3		4	
Sérum normal frais : 0 c.c. 5							
B. de Shiga 18S		B. de Shiga 18R		B. de Shiga Bucarest S		B. de Shiga Bucarest R	
Numération :		Numération :		Numération :		Numération :	
4	—	5	—	6	—	4	—
40	—	50	—	60	—	40	—
400	—	500	—	600	—	400	—
4.000	—	5.000	—	6.000	—	4.000	—
40.000	—	50.000	—	60.000	—	40.000	—
400.000	+ 4	500.000	—	600.000	—	400.000	—
4.000.000	++	5.000.000	++	6.000.000	—	4.000.000	—
40.000.000	+++	50.000.000	+++	60.000.000	+++	40.000.000	+++

Nous sommes obligé de faire quelques réserves sur l'exactitude de la numération pour les souches R. On sait que les bactéries de cette variante s'agglutinent spontanément en présence d'électrolytes et que plusieurs microbes agglutinés peuvent donner naissance à une seule colonie. Il ne semble pas cependant que cette propriété apporte un trouble considérable aux expériences. En effet, en émulsionnant dans des quantités égales d'excipient les bacilles développés pendant un même temps, sur des géloses inclinées ayant sensiblement la même surface, on obtient des suspensions pour lesquelles les numérations fournissent des chiffres très rapprochés.

E. L'ACTION DU COMPLEXE GLUCIDO-LIPIDIQUE SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM NORMAL EST-ELLE DUE A SA FRACTION HAPTÈNE ? — Sia (1926) [1], puis Ward (1930) [2] ont montré

que, dans un mélange sérum-leucocytes et dans le sang humain défibriné, le polysaccharide spécifique du pneumocoque inhibe la phagocytose de ce microbe.

En chauffant le complexe glucido-lipidique en milieu acétique, on obtient le polysaccharide libre, dépourvu de toxicité et de pouvoir antigène mais précipitable spécifiquement par un immun-sérum [43]. A. Boivin a bien voulu se charger d'effectuer ce clivage sur un échantillon de la préparation d'antigène en ramenant la solution au volume initial.

Nous avons pratiqué simultanément le titrage du pouvoir bactéricide d'un même sérum normal après adjonction :

- 1° Soit d'eau physiologique ;
- 2° Soit de doses variables de la préparation d'antigène ;
- 3° Soit de doses variables de la solution de polysaccharide, ces doses étant volumétriquement égales à celles de la préparation d'antigène.

Le tableau VI montre que 1/50 de centimètre cube de la suspension d'antigène inhibe complètement l'effet bactéricide du sérum normal pour le B. de Shiga ; 1/200 de centimètre cube produit déjà une diminution notable de cet effet. Au contraire, la solution de polysaccharide se montre absolument inactive, même à la dose de 1/10 de centimètre cube.

Plusieurs expériences semblables ont donné des résultats analogues ; le polysaccharide semble dénué d'activité vis-à-vis du sérum normal. Nous devons observer cependant que la solution haptène, en présence d'un immun-sérum, précipite à un taux notablement plus faible que la préparation originale d'antigène. Il est possible que la totalité du polysaccharide spécifique ne se retrouve pas dans la solution obtenue par clivage et qu'une concentration supérieure à celle que nous avons employée soit susceptible de produire l'inhibition.

En résumé : l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga inhibe le pouvoir bactéricide du sang défibriné et du sérum frais normal de lapin pour le B. de Shiga.

La quantité d'antigène nécessaire pour produire cette inhibition est variable d'un animal à l'autre et variable dans le temps pour un même animal. Elle n'est pas en rapport étroit avec le pouvoir bactéricide du sérum.

TABLEAU VI. — Action comparée de l'antigène glucido-lipidique et du polysaccharide libre.

NOMBRE DE B. DE SHIGA	SÉRIES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Sang défibriné frais : 0 c.c. 5								
	Préparation d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga					Solution de polysaccharide libre			
	0	1/10 de centimètre cube	1/50 de centimètre cube	1/200 de centimètre cube	1/800 de centimètre cube	1/10 de centimètre cube	1/50 de centimètre cube	1/200 de centimètre cube	1/800 de centimètre cube
4	—	+++	++++	—	—	—	—	—	—
40	—	+++	+++	—	—	—	—	—	—
400	—	+++	+++	—	—	—	—	—	—
4 000	—	+++	+++	++	—	—	—	—	—
40 000	—	++	+++	+++	—	—	—	—	—
400 000	+ 15	+++	+++	+++	+ 1	+ 2	++	++	+ 20
4 000 000	++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++
40 000 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 6.

La résistance de diverses souches de B. de Shiga à l'action du sérum normal n'est pas en fonction de leur teneur en antigène glucido-lipidique. Les souches S et R de ce bacille ont une résistance à peu près égale.

L'action inhibitrice exercée par le complexe glucido-lipidique ne semble pas due à sa fraction haptène : à volume égal, une solution de polysaccharide libre, obtenue par clivage du complexe ne provoque aucune diminution du pouvoir bactéricide, tandis que la suspension d'antigène complet produit une inhibition totale.

III. — Spécificité de l'inhibition du pouvoir bactéricide du sérum normal par l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga.

A. ACTION DE L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM POUR DES BACILLES D'ESPÈCE DIFFÉRENTE. — Nous venons de voir que l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga inhibe la propriété bactéricide du sérum normal de lapin pour ce microbe. Nous allons rechercher si cette inhibition est spécifique ou si elle s'étend à d'autres bacilles : bacilles dysentériques du type Flexner ou Hiss, B. typhique, B. paratyphique A. Toutes les souches utilisées sont lisses.

TABLEAU VII. — Spécificité de l'inhibition.

B. DE SHIGA 188	SÉRIES			B. DE FLENNER	SÉRIES		B. DE HISS	SÉRIES	
	1	2	3		4	5		6	7
	Sérum normal frais : 0 c.c. 5				Sérum normal frais : 0 c.c. 5			Sérum normal frais : 0 c.c. 5	
Nombre de B. de Shiga	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			Nombre de B. de Flexner	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme		Nombre de B. de Hiss	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme	
	0	0,2	0,02		0	0,2		0	0,2
9	—	—	—	10	—	—	12	—	—
90	—	++	—	100	—	—	120	—	—
900	—	++	—	1.000	—	—	1.200	—	—
9.000	—	++	—	10.000	—	—	12.000	—	—
90.000	—	+++	++	100.000	++	++	120.000	—	—
900.000	—	+++	+++	1.000.000	+++	+++	1.200.000	—	—
9.000.000	+	2	+++	10.000.000	+++	+++	12.000.000	++	+
90.000.000	+++	+++	+++	100.000.000	+++	+++	120.000.000	+++	+++

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.

Chaque expérience comporte trois séries témoins dont les tubes reçoivent des bacilles de Shiga. La première montre que le sérum utilisé possède un pouvoir bactéricide élevé pour ce bacille : 1/2 cent. cube détruit 900.000 (tableau VII) ou

TABLEAU VIII. — Spécificité de l'inhibition.

B. DE SHIGA 18S	SÉRIES			B. TYPHIQUE	SÉRIES		B. PARA- TYPHIQUE A	SÉRIES	
	1	2	3		4	5		6	7
	Sérum normal frais : 0 c.c. 5				Sérum normal frais : 0 c.c. 5			Sérum normal frais : 0 c.c. 5	
Nombre de B. de Shiga	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			Nombre de B. typhiques	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme		Nombre de B. para- typhiques A	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme	
	0	0.2	0.02		0	0,2		0	0,2
6	—	+++	—	6	—	—	12	—	—
60	—	++++	+ 20	60	—	—	120	—	—
600	—	++++	++	600	—	—	1.200	—	—
6.000	—	++++	+++	6.000	—	—	12.000	—	—
60.000	—	++++	++++	60.000	—	—	120.000	—	—
600.000	—	++++	++++	600.000	+ 2	++	1.200 000	—	—
6.000.000	—	++++	++++	6.000.000	+++	+++	12.000 000	++	++
60.000.000	+++	+++	+++	60.000.000	+++	+++	120.000.000	+++	+++

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.

6.000.000 de bacilles (tableau VIII) ; la deuxième, que 0 milligr. 2 d'antigène diminue fortement ou supprime complètement ce pouvoir ; la troisième, qu'une dose dix fois moindre d'antigène produit encore une inhibition sensible.

Dans les séries suivantes, comprenant des bacilles d'espèces diverses, le pouvoir bactéricide du sérum pour les bacilles de Flexner ou de Hiss, le B. typhique, le B. paratyphique A n'est pas modifié par l'adjonction de 0 milligr. 2 du complexe glucido-lipidique du B. de Shiga. Nous devons signaler toutefois que, dans les expériences avec le bacille typhique les résultats sont un peu moins réguliers qu'avec les autres microbes : par exemple un sérum dont 1/2 cent. cube détruit 700.000 bacilles typhiques peut, en présence du complexe, n'en détruire que 70.000. Cependant, les différences sont minimales : l'action du complexe glucido-lipidique du B. de Shiga est spécifique.

B. ACTION DE L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM POUR LE B. DE SHIGA R. — La variante

rugueuse du B. de Shiga diffère essentiellement de la variante lisse par l'absence de l'antigène O spécifique [14]. Cependant, si l'on ajoute à du sérum frais, en même temps que des bacilles R, cet antigène O, sous forme du complexe glucido-lipidique, les bacilles ne retrouvent pas les caractéristiques originales des souches lisses et leur sensibilité n'est pas modifiée (tableau IX).

TABLEAU IX. — **Spécificité de l'inhibition.**

B. DE SHIGA		SÉRIES			B. DE SHIGA		SÉRIES		
Bucarest S					Bucarest R				
		1	2	3			4	5	6
Nombre		Sérum normal frais : 0 c.c. 5			Nombre		Sérum normal frais : 0 c.c. 5		
de		Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			de		Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme		
B. de Shiga S					B. de Shiga R				
		0	0,2	0,02			0	0,2	0,02
6	—	+	—	5	—	—	—	—	—
60	—	++	—	50	—	—	—	—	—
600	—	+++	+	500	—	—	—	—	—
6.000	—	+++	++	5.000	—	—	—	—	—
60 000	—	+++	+++	50 000	—	—	—	—	—
600.000	—	+++	+++	500.000	—	—	—	—	—
6 000.000	—	+++	+++	5.000.000	—	—	—	—	—
60 000.000	+++	+++	+++	50.000.000	++	++	++	++	++
Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.									

Une dose de 0 milligr. 2 d'antigène, qui inhibe complètement le pouvoir bactéricide de 0 c. c. 5 de sérum frais pour les bacilles de Shiga S, est absolument sans effet pour les bacilles de Shiga R. Ceux-ci sont détruits par le sérum comme des bacilles d'espèce différente.

En résumé : l'inhibition du pouvoir bactéricide du sérum frais normal par l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga est spécifique. L'effet bactéricide du sérum est conservé pour les B. de Flexner et de Hiss, le B. typhique et le B. paratyphique A. Il reste intact pour les B. de Shiga de la variante R qui se comportent comme des bacilles d'espèce différente.

IV. — Neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène par un sérum anti-antigène glucido-lipidique.

La spécificité de l'inhibition du pouvoir bactéricide du sérum frais par l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga pourrait n'être qu'une apparence due à quelque substance favorisant spécifiquement la culture de ce bacille [15]. Cette hypothèse devra être écartée s'il est possible de neutraliser l'action de l'antigène par un sérum anti-antigène glucido-lipidique.

Mais avant d'étudier cette neutralisation nous devons voir rapidement l'effet de ce sérum expérimental lui-même sur le pouvoir bactéricide normal.

A. ACTION DU SÉRUM ANTI-ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE D'UN SÉRUM NORMAL. — Neisser et Wechsberg (1901) [16] ont montré qu'un excès d'anticorps empêche l'action bactéricide. Buxton (1904-1905) [17] a trouvé qu'un immun-sérum antityphique frais n'a pas d'action sur le B. typhique, mais conserve les propriétés bactéricides d'un sérum normal sur le vibrion du choléra. Thjotta (1920) [18] a étudié le phénomène de Neisser-Wechsberg en utilisant un sérum anti-B. de Shiga. Nous avons nous-même constaté avec plusieurs sérums frais anti-B. de Shiga S, obtenus par injections intraveineuses de suspensions bacillaires, une inhibition du pouvoir bactéricide pour le B. de Shiga S avec conservation de l'activité sur le B. de Hiss et le B. de Shiga R.

En ajoutant, en quantité variable, du sérum de lapin anti-antigène glucido-lipidique à une quantité fixe de sang frais défibriné ou à du sérum frais, nous observons là encore une inhibition plus ou moins marquée du pouvoir bactéricide, dans les séries de tubes contenant une quantité élevée d'anticorps. Le pouvoir bactéricide reste normal pour les bacilles de Flexner, le B. paratyphique A, le B. de Shiga R.

Quelle que soit la dilution du sérum anti-antigène glucido-lipidique, le pouvoir bactéricide ne paraît jamais nettement supérieur à celui du sérum normal.

B. NEUTRALISATION DE L'ACTION INHIBITRICE DE L'ANTIGÈNE PAR UN SÉRUM ANTI-ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE. — Pour rechercher la neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène par un sérum anti-antigène glucido-lipidique, du sang de lapin, fraîchement défibriné, est réparti dans plusieurs séries de 8 tubes (tableau X). La première série, qui ne reçoit que des bacilles

TABLEAU X. — Neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène glucido-lipidique (sang).

		SÉRIES							
		1	2	3	4	5	6	7	8
NOMBRE		Sang défibriné : 0 c.c. 5							
de		Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme							
B. de Shiga S		0	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018
		Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube							
		0	0	1/0	1/40	1/160	1/640	1/2.500	1/10.000
8	—	+++	++	—	—	—	—	—	+++
80	—	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
800	—	+++	+++	++	—	—	—	—	+++
8.000	—	+++	+++	++	—	—	—	+++	+++
80.000	—	+++	+++	++	+ 20	+ 25	+++	+++	+++
800.000	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
8.000.000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
80.000.000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		PROZONE			ZONE		POSTZONE		
Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.									

de Shiga, indiquera le pouvoir bactéricide du sang. Dans tous les autres tubes, nous ajoutons, avant ensemencement une quantité fixe d'antigène (0 milligr. 018) suffisante pour produire l'inhibition spécifique. La deuxième série montrera si cette inhibition est obtenue. Enfin, dans tous les autres tubes, nous distribuons sous un volume de 0 c. c. 1 des doses, variables et décroissantes pour chaque série, du sérum immum : dans les tubes de la troisième série : 0 c. c. 1 de sérum pur, dans les tubes de la quatrième : 0 c. c. 1 de sérum dilué

au $1/4$, etc... Dans l'une de ces séries, l'antigène doit se trouver à peu près exactement neutralisé.

Le sang est capable de détruire 80.000 bacilles de Shiga. L'adjonction de 0 milligr. 018 d'antigène produit une inhibition totale du pouvoir bactéricide. Une forte quantité d'immun-sérum, $1/10$ de centimètre cube, n'empêche pas cette inhibition. Cependant, $1/160$ ou $1/640$ de centimètre cube d'immun-sérum ramène sensiblement le pouvoir bactéricide à sa puissance normale. Une dilution plus forte ne neutralise plus l'antigène et $1/10.000$ de centimètre cube laisse reparaître une inhibition totale.

Il existe donc une dose de sérum anti-antigène glucido-lipidique susceptible de neutraliser l'action inhibitrice qu'exerce l'antigène sur le pouvoir bactéricide du sang normal défibriné, mais la neutralisation ne se produit que dans une « zone » assez étroite, limitée d'une part par une « prozone » où il y a excès d'anticorps et une « postzone » où les anticorps sont insuffisants.

Ward [2] a observé un phénomène semblable en neutralisant par un immun-sérum l'action inhibitrice du polysaccharide du pneumocoque sur la phagocytose de ce microbe. Il a pensé que la « prozone » était due à l'action du précipité sur les leucocytes.

Dans ces expériences avec le B. de Shiga, sensible à l'action du sérum, sans intervention des cellules, une semblable explication ne peut être acceptée. D'ailleurs on obtient des résultats analogues en utilisant du sérum frais au lieu de sang défibriné (tableau XI).

Un demi cent. cube de sérum détruit 800.000 B. de Shiga ; 0 milligr. 036 d'antigène inhibe complètement ce pouvoir bactéricide puisque 8 bacilles cultivent abondamment. Si l'on ajoute $1/5$ de centimètre cube de sérum anti-antigène l'inhibition est à peine modifiée (culture de 80 bacilles). Au contraire, une dose de $1/80$ à $1/320$ de sérum ramène le pouvoir bactéricide à sa normale. Puis, pour des dilutions plus fortes, les anticorps deviennent insuffisants et l'inhibition est à nouveau totale.

TABLEAU XI. — Neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène glucido-lipidique (sérum).

NOMBRE de B. de Shiga S	SÉRIES							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Sérum frais normal : 0 c.c. 5							
	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme							
	0	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036
	Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube							
	0	0	1/5	1/20	1/80	1/320	1/1.250	1/5.000
8	—	++	—	—	—	—	—	— 4
80	—	+++	++	—	—	—	—	++
800	—	+++	+++	+ 10	—	—	—	+ 12
8 000	—	+++	+++	+ 2	—	—	—	++
80 000	—	+++	+++	+++	—	—	—	+++
800 000	—	+++	+++	+++	—	—	+++	+++
8.000 000	+ 3	+++	+++	+++	+ 2	—	+++	+++
80.000.000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		PROZONE			ZONE		POSTZONE	

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 8.

C. MÉCANISME DE L'INHIBITION DU POUVOIR BACTÉRICIDE DANS LA PROZONE. — L'inhibition du pouvoir bactéricide du sang ou du sérum dans la prozone, causée par la présence simultanée d'antigène glucido-lipidique et de son immun-sérum en excès, ne paraît pas relever du même mécanisme que l'inhibition spécifique produite par l'un ou l'autre de ces facteurs (tableau XII).

Le pouvoir bactéricide de 1/2 cent. cube de sang défibriné qui détruit 60.000 bacilles de Shiga est légèrement diminué pour ce microbe par l'adjonction de 0 c. c. 1 de sérum anti-antigène homologue. Il est complètement inhibé par 0 milligr. 018 d'antigène et aussi par la présence simultanée de ces deux facteurs. Si nous préparons en même temps une expérience identique mais avec des B. de Flexner au lieu de B. de Shiga, on voit que ni le sérum anti-antigène, ni l'antigène du B. de Shiga ne modifie le pouvoir bactéricide du sang défibriné

TABLEAU XII. — Inhibition non spécifique dans la « prozone » (sang).

B. DE SHIGA		SÉRIES				B. DE FLEXNER		SÉRIES			
18S		1	2	3	4			5	6	7	8
Nombre do B. de Shiga	Sang défibriné : 0 c.c. 5				Nombre de B. de Flexner	Sang défibriné : 0 c.c. 5					
	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme					Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme					
	0	0	0,018	0,018		0	0	0,018	0,018		
	Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube					Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube					
	0	0,1	0	0,1		0	0,1	0	0,1		
6	—	—	++	—	7	—	—	—	++		
60	—	—	++	++++	70	—	—	—	++++		
600	—	—	++++	++++	700	—	—	—	++++		
6 000	—	—	++++	++++	7.000	—	—	—	++++		
60.000	—	++	++++	++++	70.000	+, +	+++	++	++++		
600 000	++	++++	++++	++++	700.000	+++	++++	++++	++++		
6.000.000	++	++++	++++	++++	7.000.000	+++	++++	++++	++++		
60.000.000	+++	++++	++++	++++	70.000.000	+++	++++	++++	++++		
Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.											

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.

pour le B. de Flexner : dans les séries 6 et 7, comme dans la cinquième, le sang détruit 7.000 de ces bacilles. Au contraire, dans la huitième série, qui contient simultanément l'antigène du B. de Shiga et son immun-sérum : 7 bacilles de Flexner fournissent une culture abondante.

Une expérience semblable peut être réalisée avec du sérum frais au lieu de sang défibriné. Elle donne des résultats identiques en utilisant au lieu du B. de Flexner le B. paratyphique A (tableau XIII).

Dans l'expérience que nous relatons, on peut remarquer que l'inhibition du pouvoir bactéricide est plus fortement marquée pour le B. paratyphique A que pour le B. de Shiga.

Notons qu'au cours de plusieurs essais nous n'avons pas pu obtenir d'inhibition pour le B. de Shiga R.

Le pouvoir bactéricide du sérum frais est donc inhibé d'une façon spécifique par l'antigène glucido-lipidique du B. de

TABLEAU XIII. — Inhibition non spécifique
dans la « prozone » (sérum).

B. DE SHIGA		SÉRIES				B. PARA-		SÉRIES			
18S		1	2	3	4	TYPHIQUE A		5	6	7	8
Nombre de B. de Shiga		Sérum normal frais : 0 c.c. 5				Nombre de B. para- typhiques A		Sérum normal frais : 0 c.c. 5			
		Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme						Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			
		0	0	0,044	0,044			0	0	0,044	0,044
		Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube						Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube			
		0	0,02	0	0,2			0	0,02	0	0,02
13		—	—	—	—	16		—	—	—	—
130		—	—	—	—	160		—	—	—	+++
1.300		—	—	++	+ 8	1.600		—	—	—	+++
13.000		—	—	++	+ 13	16.000		—	—	—	+++
130.000		—	—	+++	+++	160.000		—	—	—	+++
1.300.000		—	+ 8	+++	+++	1.600.000		—	—	—	+++
13.000.000		+ 15	+++	+++	+++	16.000.000		—	—	—	+++
130.000.000		+++	+++	+++	+++	160.000.000		+++	+ 11	++	+++
Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 8.											

Shiga, et, d'une façon non spécifique, par l'antigène et son immun-sérum en excès.

D. L'INHIBITION DU POUVOIR BACTÉRICIDE EST-ELLE DUE A LA FIXATION DE L'ALEXINE ? — La fixation de l'alexine expliquerait de façon simple ce phénomène, mais l'alexine est-elle fixée ?

Mettons dans 3 tubes : soit du sérum frais normal, soit du sérum frais et de l'antigène, soit du sérum frais, de l'antigène et un excès de sérum anti-antigène glucido-lipidique. Les volumes sont égalisés par addition d'eau physiologique. Nous laissons les tubes à 37° pendant une heure et demie, puis, après avoir réparti le contenu de chacun d'eux, nous titrons son pouvoir bactéricide pour le B. de Shiga, suivant la technique habituelle. Ce pouvoir est conservé dans la série qui contient le sérum normal ; il est disparu dans les séries qui

contiennent soit le sérum et l'antigène, soit le sérum, l'antigène et l'immun-sérum.

L'alexine, cependant, titrée en présence de globules rouges de mouton sensibilisés, est seulement diminuée de moitié pour l'un et l'autre de ces mélanges, par rapport au sérum témoin. Cette diminution ne peut expliquer l'inhibition du pouvoir bactéricide.

En résumé, il existe une dose de sérum anti-antigène glucido-lipidique susceptible de neutraliser l'action inhibitrice spécifique qu'exerce l'antigène du B. de Shiga sur le pouvoir bactéricide du sérum frais normal.

La neutralisation se produit seulement dans une « zone », assez étroite, limitée d'une part par une « prozone » où il y a excès d'anticorps et une « post-zone » où les anticorps sont insuffisants.

L'inhibition du pouvoir bactéricide dans la « prozone » due à la présence simultanée d'antigène et d'un excès d'anticorps correspondant, n'est pas spécifique. Cette inhibition n'est pas due à la fixation de l'alexine.

Conclusions.

1° L'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga S inhibe le pouvoir bactéricide du sang défibriné ou du sérum frais de lapin pour le B. de Shiga S.

2° La quantité d'antigène nécessaire pour produire cette inhibition est variable d'un animal à l'autre et variable dans le temps pour un même animal. Elle ne semble pas être en rapport étroit avec le pouvoir bactéricide.

3° Une solution de polysaccharide libre obtenue par clivage du complexe glucido-lipidique et employée en quantité volumétriquement égale à celle de la préparation d'antigène complet ne provoque pas l'inhibition du pouvoir bactéricide.

4° Les variantes R du B. de Shiga, quoiqu'elles ne contiennent pas l'antigène glucido-lipidique, peuvent montrer une résistance à l'action bactéricide du sérum sensiblement égale à celle des souches S.

5° L'inhibition du pouvoir bactéricide par le complexe glucido-lipidique du B. de Shiga est spécifique. L'activité du sérum

normal est conservée vis-à-vis des B. dysentériques de Flexner ou de Hiss et des B. typhique ou paratyphique A.

6° Elle n'est pas modifiée non plus pour les B. de Shiga de la variante R. Ces bacilles, au cours de l'expérience, n'ont pas présenté de retour à la forme S.

7° L'action inhibitrice spécifique de l'antigène peut être neutralisée par une quantité convenable de sérum anti-antigène glucido-lipidique mais dans une « zone » assez étroite limitée par une « prozone » où il y a excès d'anticorps et une « post-zone » où les anticorps sont insuffisants. Le phénomène s'observe aussi bien en présence de sérum frais que de sang défibriné.

8° L'inhibition du pouvoir bactéricide dans la « prozone » n'est pas spécifique. Elle se manifeste pour le B. de Flexner ou le B. paratyphique A aussi bien que pour le B. de Shiga. Cette inhibition n'est pas due à la fixation de l'alexine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SIA (R. H. P.). *J. Exp. Med.*, **43**, 1926, p. 633.
- [2] WARD (H. K.). *J. Exp. Med.*, **51**, 1930, p. 675 et p. 685.
- [3] BOIVIN (A.), MESROBEANU (L.) et MESROBEANU (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 1933, p. 307. — BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). *Rev. Immunol.*, **1**, 1935, p. 553 ; **2**, 1936, p. 113 ; **3**, 1937, p. 319 ; **4**, 1938, p. 40, 197, 469.
- [4] FÉLIX (A.) et OLITZKI (L.). *J. Imm.*, **11**, 1926, p. 31.
- [5] WHITE (P. B.). *J. Path. a. Bact.*, **32**, 1929, p. 85. — THIBAULT (P.) et BRAUNBERGER (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 434.
- [6] NICOLLE (M.), JOUAN (C.) et DEBAINS (E.). *Ces Annales*, **33**, 1919, p. 318.
- [7] MACKIE (T. J.), FINKELSTEIN (M. H.) et VAN ROOYEN (C. E.). *J. Hyg.*, **32**, 1932, p. 494.
- [8] FIESSINGER (N.) et CATTAN (R.). *La Presse Médicale*, 1928, p. 1185.
- [9] ROUS (P.) et JONES (F. S.). *J. Exp. Med.*, **23**, 1916, p. 601.
- [10] BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). *Rev. Immunol.*, **2**, 1936, p. 113.
- [11] BORDET (J.) et RENAUX (E.). *Ces Annales*, **49**, 1932, p. 539.
- [12] MACKIE (T. J.) et FINKELSTEIN (M. H.). *J. Hyg.*, **32**, 1932, p. 1.
- [13] BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). *Rev. Immunol.*, **1**, 1935, p. 553.
- [14] ARKWRIGHT (J. A.). *J. Path. a. Bact.*, **24**, 1921, p. 36. — WHITE (P. B.). *Med. Res. Council Spec. Rep.*, n° 103, 1926. — THIBAULT (P.) et BRAUNBERGER (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 617.
- [15] GORDON (J.) et HOYLE (L.). *J. Path. a. Bact.*, **43**, 1936, p. 545.
- [16] NEISSER (M.) et WECHSBERG (F.). *Münch. med. Woch.*, **48**, 1901, p. 697.
- [17] BUXTON (B. H.). *J. Med. Res.*, **13**, 1904-1905, p. 305, 431, 461.
- [18] THJOTTA (Th.). *J. Imm.*, **5**, 1920, p. 1.

RECHERCHES SUR QUELQUES BASES SYNTHÉTIQUES ANTAGONISTES DE L'HISTAMINE (*)

par ANNE-MARIE STAUB.

(*Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie thérapeutique.*)

DEUXIÈME PARTIE

LÉGITIMITÉ DE LA NOTION D'ANTI-HISTAMINIQUE

Dans la première partie de ce travail nous avons montré que l'action antitoxique constatée sur le choc histaminique du cobaye s'étend à toutes les manifestations de l'histamine sur les muscles lisses ; elle mérite bien de ce fait le nom d'anti-histaminique.

Toutefois, l'histamine n'est pas le seul excitant des fibres lisses : l'acétylcholine, le chlorure de baryum agissent dans le même sens qu'elle. A ces excitants s'opposent déjà des antagonistes connus : parasympatholytiques et spasmolytiques. Pouvons-nous adopter comme nouvelle et spécifique la notion d'antihistaminique ou devons-nous rattacher nos produits à l'un de ces groupes ?

Parasympatholytiques ? La réponse nous sera donnée par la comparaison des principaux antihistaminiques (929 F et 1571 F) avec l'atropine.

Spasmolytiques ? la réponse nous sera fournie par la comparaison avec la papavérine ou un spasmolytique de synthèse récemment étudié par Halpern [41] sous le nom de « Propavine » : l'Ester propyléthylacétique du diéthylaminoéthanol :



(*) Voir *Ces Annales*, 63, 1939, p. 400.

A. — INTESTIN DE COBAYE.

C'est à l'intestin de cobaye que nous nous sommes adressée tout d'abord. On sait que sur cet organe l'acétylcholine provoque régulièrement une contraction unique, brève ou durable, suivant les intestins, tout à fait comparable à celle obtenue avec l'histamine. Les doses actives correspondent exactement à celles de ce poison : 0 milligr. 01 (4) de l'un comme de l'autre produisant la contraction maximum de l'anse intestinale. Quant au chlorure de barium, il manifeste une action très inconstante. Dans la majorité des cas, 20 milligrammes provoquent une élévation tonique moyenne suivie de nombreuses contractions plus ou moins accentuées ; toutefois, cette dose peut ne provoquer que des mouvements péristaltiques sans élever le tonus musculaire ; elle peut aussi provoquer une très forte contraction. Du moins sur une même anse l'action reste-t-elle constante.

1° ACTION DES ANTIHISTAMINIQUES 929 F ET 1571 F. — Nous avons donc recherché l'action du 929 F et du 1571 F sur les trois contractions provoquées par 0 milligr. 01 d'histamine, 0 milligr. 01 d'acétylcholine et 20 milligrammes de BaCl_2 . Après 0 milligr. 1 de l'un ou de l'autre antihistaminique tout intestin est inexcitable par l'histamine. Que deviennent alors les actions des deux autres excitants ?

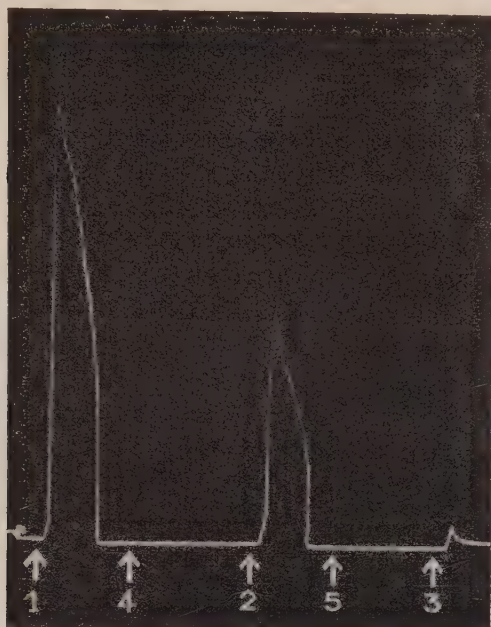
Après 929 F, la réponse à l'acétylcholine est plus ou moins complètement supprimée ; la réponse au BaCl_2 est très fortement diminuée.

Après 1571 F, les réponses à l'acétylcholine et au BaCl_2 ne sont que faiblement ou pas du tout diminuées.

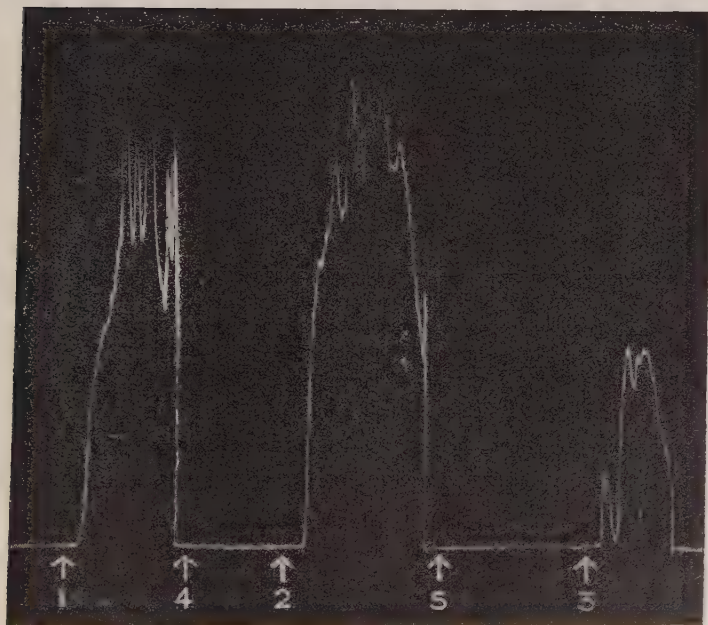
Dans tous les cas, sur un même intestin, les réponses aux deux excitants, après 1571 F, sont toujours beaucoup plus fortes qu'après 929 F.

2° ACTION DES SPASMOLYTIQUES. — La papavérine et la « Propavine », essayées contre l'histamine, se sont révélées actives

(4) Toutes les doses sont données dans 100 cent. cubes d'un bain d'une solution de Tyrode-Webster.



A

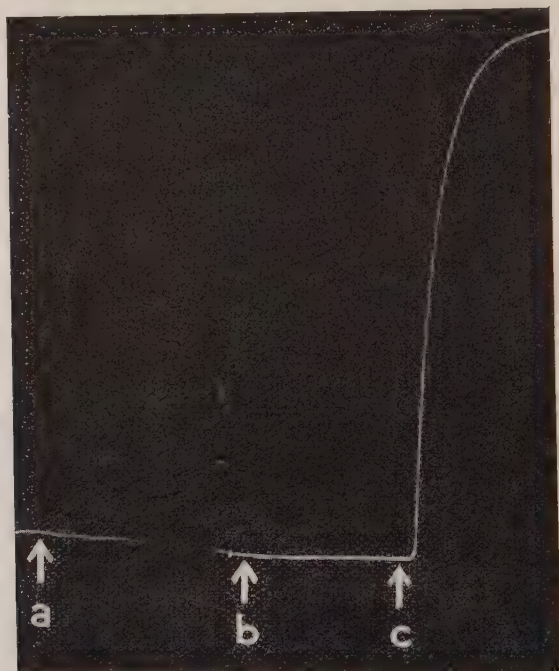


B

GRAPHIQUE IX. — Intestin de cobaye isolé, bain de 100 cent. cubes. A, Action de 0 milligr. 01 d'acétylcholine (1, 2, 3) dans la solution de Tyrode-Webster pure et après 0 milligr. 1 de 1571 F (4) ou de 929 F (5); B, action de 20 milligrammes de BaCl_2 (1, 2, 3) dans la solution de Tyrode-Webster pure et après 0 milligr. 1 de 1571 F (4) ou de 929 F (5).

à des doses semblables, voisines de 2 milligrammes, soit environ 20 à 40 fois supérieures à celles obtenues avec le 929 F et le 1571 F.

3° ACTION DES PARASYMPATHOLYTIQUES : ATROPINE. — L'atropine supprime l'action de l'histamine aux mêmes doses que

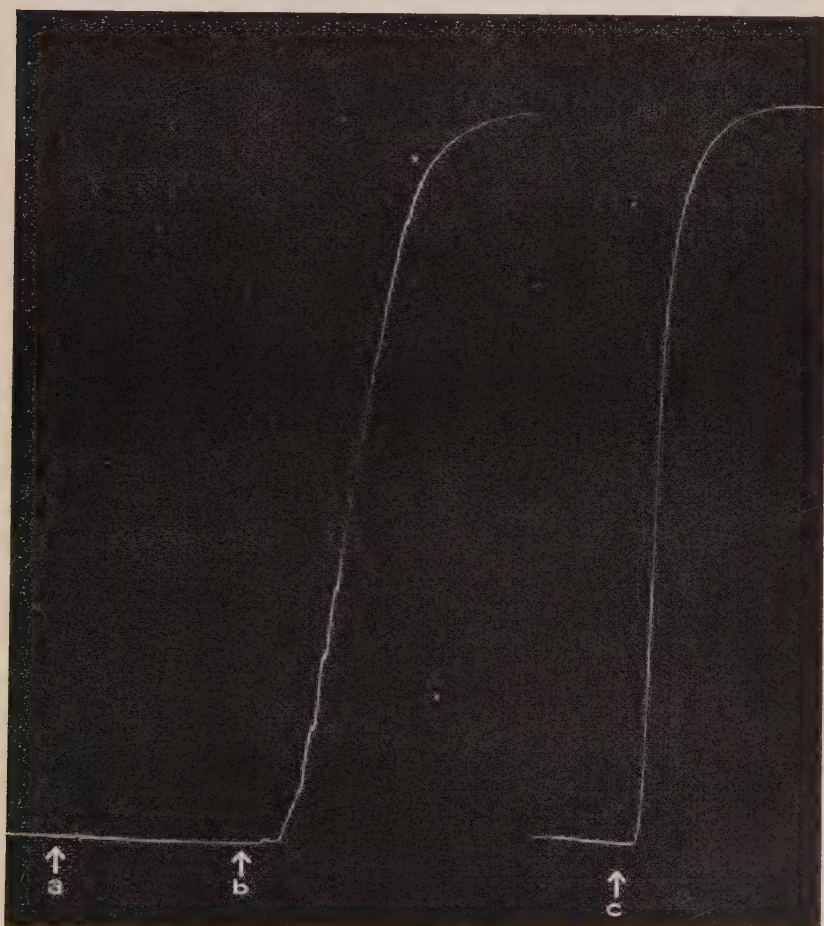


GRAPHIQUE X. — Utérus de cobaye, bain de 50 cent. cubes additionné de 2 milligrammes de 929 F. *a*, BaCl₂; *b*, histamine 0 milligr. 02; *c*, acétylcholine 5 milligrammes.

le 929 F et 1571 F, soit 0,05 et 0 milligr. 1. Ce résultat s'oppose à ceux obtenus par Dale et Laidlaw [23] ; il rejoint, par contre, les conclusions de tous ceux qui, depuis, ont repris la question : Mackay [54], Krishnan [47], Bernheim [8], Feldberg [30]. Ce dernier conclut, en effet, qu'il est impossible de supprimer l'action de l'acétylcholine sur l'intestin de cobaye sans diminuer fortement, sinon supprimer, celle de l'histamine.

B. — UTÉRUS DE COBAYE.

On sait l'extraordinaire sensibilité de l'utérus de cobaye non gravide vis-à-vis de l'histamine. Alors que l'acétylcholine



GRAPHIQUE XI. — Utérus de cobaye isolé, bain de 50 cent. cubes additionné de 2 milligrammes d'atropine. *a*, acétylcholine 5 milligrammes; *b*, histamine 0 milligr. 02; *c*, BaCl₂ 10 milligrammes.

et le chlorure de baryum ne provoquent une contraction maxima qu'aux doses respectives de 5 milligrammes et 10 mil-

ligrammes (5), le même résultat peut être atteint avec 0 milligr. 02 d'histamine. La forme de la contraction est, dans les trois cas, superposable : forte contraction durable.

1° ACTION DES ANTIHISTAMINIQUES : 929 F. — Nous avons déjà signalé les difficultés rencontrées dans l'étude de l'action antihistaminique sur cet organe : la comparaison n'a donc été effectuée qu'avec le 929 F. L'addition de 2 milligrammes de ce produit à un bain de 50 cent. cubes, dans les conditions indiquées au Chapitre II, supprime totalement l'action de 0 milligr. 02 d'histamine ; elle supprime aussi totalement l'action de 10 milligrammes de BaCl_2 ; par contre, elle ne touche pas à l'action de 5 milligrammes d'acétylcholine (Graphique X).

2° ACTION DES PARASYMPATHOLYTIQUES : ATROPINE. — L'action nettement spécifique de l'atropine vis-à-vis de l'acétylcholine sur l'utérus a déjà été signalée par Feldberg [30]. Nous avons pu nous-même vérifier que 4 milligrammes d'atropine ajoutés au bain de 50 cent. cubes rendaient l'utérus insensible à l'action de 5 milligrammes d'acétylcholine, alors qu'il réagissait encore parfaitement à l'histamine et au chlorure de barium (Graphique XI).

3° ACTION DES SPASMOLYTIQUES : PAPAVERINE. — Avec la papavérine, il est impossible d'obtenir la dissociation entre les trois excitations. La dose de 4 milligrammes nécessaire pour

TABLEAU XIV.

NATURE DU BAIN Tyrode 50 cent. cubes avec	HISTAMINE 0 milligr. 02	ACÉTYLCHOLINE 5 milligrammes	BaCl_2 10 milligrammes
Atropine, 2 milligrammes . .	+	0	+
929 F, 2 milligrammes. . . .	0	+	0
Papavérine, 2 milligrammes .	0	0	0
0, sans effet; +, contraction.			

(5) Les doses sont données dans un bain de 50 cent. cubes de solution de Tyrode.

empêcher l'action de 10 milligrammes de BaCl_2 rend l'utérus pareillement inexcitable par l'acétylcholine et l'histamine.

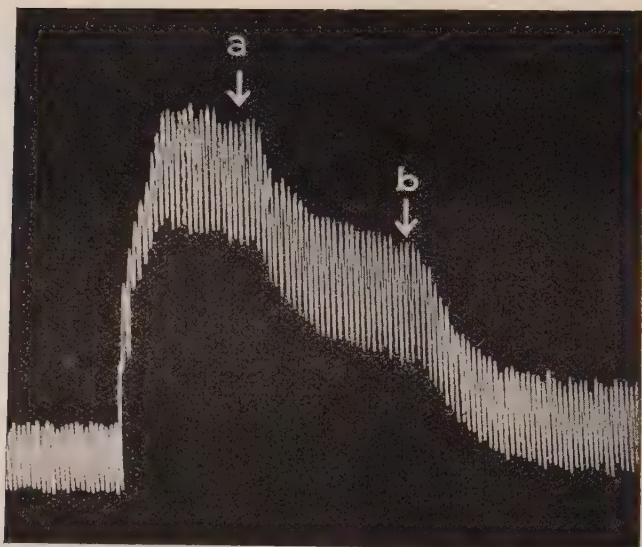
Le tableau XIV résume d'une façon schématique mais suggestive les résultats obtenus sur l'utérus de cobaye.

C. — INTESTIN DE LAPIN.

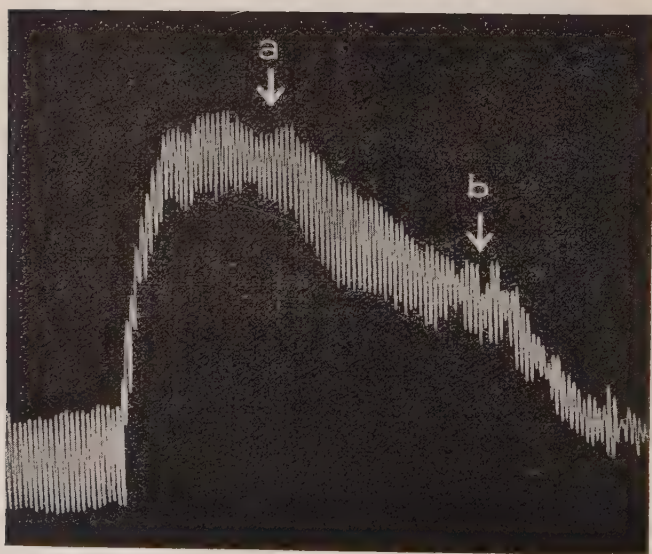
Nous avons suivi sur cet organe la technique préconisée par Fromherz [35] pour l'étude des spasmolytiques. Nous avons comparé ainsi l'action du 929 F et de quelques produits à celles de l'atropine et de la papavérine sur le spasme provoqué par l'acétylcholine ou le chlorure de barium.

Une anse intestinale de 2 à 3 centimètres est prélevée sur un lapin saigné par section des carotides, après avoir été endormi au narcosol ou à l'évipan ; l'anse est immédiatement plongée dans une solution de Tyrode aux environs de 38° (NaCl , 8 ; CaCl_2 , 0,20 ; KCl , 0,20 ; MgCl_2 , 0,01 ; Co_3NaH , 1 ; $\text{Po}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,05 ; glucose, 1 ; eau, q. s. pour 1.000), puis suspendue à un stylet inscripteur dans un bain de la même solution aéré et maintenu à 38° . Dans de telles conditions, le péristaltisme intestinal se maintient pendant une heure et plus. On obtient alors une contraction tonique de l'intestin, avec arrêt plus ou moins accentué du péristaltisme, lorsqu'on ajoute au bain 0 milligr. 1 d'acétylcholine ou 20 milligrammes de BaCl_2 . L'addition d'un spasmolytique au bain, pendant cette contraction, relâche l'intestin. L'activité spasmolytique du produit est alors mesurée par la dose capable de produire le relâchement total du spasme.

1° ACTION DES PARASYMPATHOLYTIQUES : ATROPINE. — L'action spécifique de l'atropine sur l'acétylcholine est encore très nette sur cet organe. L'atropine relâche en effet le spasme provoqué par 0 milligr. 1 d'acétylcholine dès la dose de 0 milligr. 005 (dans un bain de 100 cent. cubes), tandis que 10 milligrammes ne relâchent pas encore le spasme provoqué par 20 milligrammes de BaCl_2 . Ces chiffres fournis par nos expériences personnelles s'apparentent tout à fait à ceux obtenus par Fromherz (0 milligr. 001 à 0 milligr. 01) [Graphique XII].



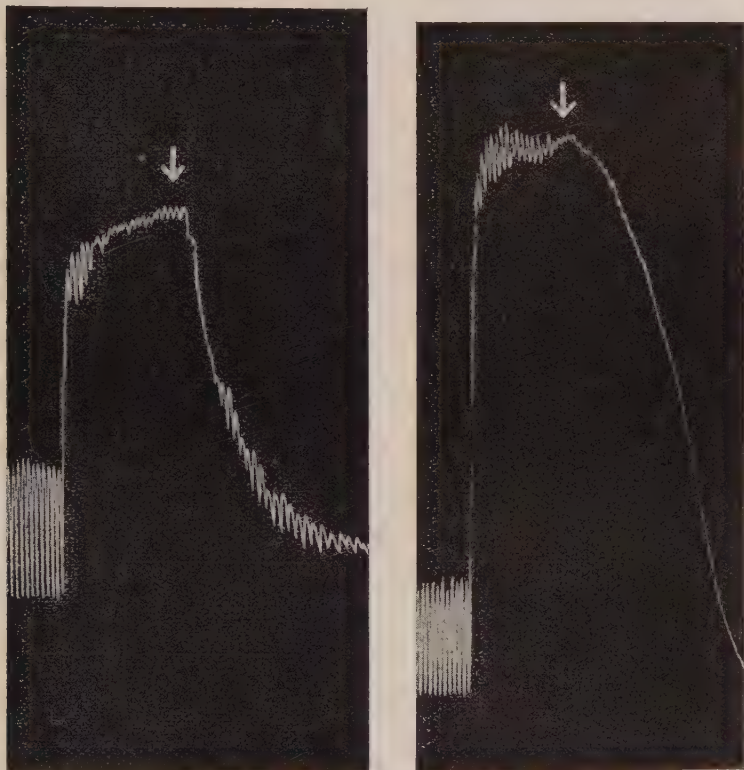
I



II

GRAPHIQUE XII. — Pouvoir spasmolytique, contraction d'une anse intestinale isolée de lapin sous l'action de 0 milligr. 2 d'acétylcholine (bain de 100 cent. cubes). En I : *a*, addition de 0 milligr. 001 ; *b*, addition de 0 milligr. 003 d'atropine. En II : *a*, addition de 0 milligr. 5 ; *b*, addition de 1 milligramme de 929F.

2° ACTION DES SPASMOLYTIQUES : PAPAVERINE, PROPAVINE. — A l'inverse de l'atropine, les spasmolytiques agissent à la même dose sur l'acétylcholine et sur le chlorure de barium : 2 à 5 milligrammes de papavérine relâchent le spasme provoqué par 0 milligr. 4 d'acétylcholine comme celui provoqué par



III












IV

GRAPHIQUE XII bis. — Pouvoir spasmolytique, contraction d'une anse intestinale isolée de lapin sous l'action de 0 milligr. 2 d'acétylcholine (bain de 100 cent. cubes). En III, addition de 10 milligrammes de 1571 F. En IV, addition de 5 milligrammes de papavérine.

20 milligrammes de BaCl_2 ; 0,5 à 1 milligramme de « Propavine » relâchent les deux spasmes d'égale façon (Graphique XII bis).

3° ACTION DES ANTIHISTAMINIQUES. — Les antihistaminiques

TABLEAU XIV bis.

NUMÉRO	FORMULE CHIMIQUE	SÉRIE CHIMIQUE	DOSES actives sur le spasme provoqué par l'acétyl- choline en milligrammes
929 F		Phénoxyéthylamine.	0,5-1
1379 F		Phénoxyéthylamine.	1-2
1655 F		Phénoxyéthylamine.	2-5
1482 F		Phénoxyéthylamine.	2
928 F		Phénoxyéthylamine.	10-50
1571 F		Ethylènediamine.	5-10
1691 F		Ethylènediamine.	2
1335 F		Ethylènediamine.	20
1599 F		Ethylènediamine.	2
1699 F		Ethylènediamine.	1
1167 F		Ethylènediamine.	10-20

sont capables de relâcher le spasme intestinal provoqué par l'acétylcholine ou le BaCl_2 . Par leur mode d'action, ils se rattachent aux spasmolytiques : la même dose relâche l'intestin contracté par l'un ou l'autre excitant. Il a été impossible de comparer par cette méthode l'action antihistaminique et l'action spasmolytique, car l'histamine n'exerce qu'un effet minime sur cet organe.

On remarque tout de suite, dans la liste du tableau XIV bis, les doses plus élevées correspondant à une action spasmolytique plus faible du 928 F parmi les phénoxyéthylamines, des 4574 F, 1335 F et 4167 F parmi les Nphényléthylènediamines. Or, en se reportant aux formules chimiques, on constate que ces quatre corps sont justement ceux dont le noyau ne porte aucune substitution. On en conclut donc à l'augmentation d'activité spasmolytique par l'apport sur le noyau d'un groupe-ment méthyl ou isopropyl.

D. — DISCUSSION.

De tous ces faits, nous pourrions tirer trois conclusions :

1° Les produits étudiés ne peuvent pas être assimilés aux parasympatholytiques dans leur action sur les muscles lisses. En effet, si l'action de l'atropine s'apparente à celle des antihistaminiques sur l'intestin du cobaye, elle s'en écarte totalement sur les organes où sa spécificité vis-à-vis de l'acétylcholine est très marquée : utérus de cobaye, intestin de lapin.

2° Les expériences effectuées *in vitro* sur les intestins et l'utérus du lapin et du cobaye ont permis de mettre en évidence l'action spasmolytique du 929 F. Cet effet, comme d'ailleurs celui des autres phénoxyéthylamines se rapproche, à cet égard de celui que l'on peut reconnaître à la papavérine ou à la « Propavine » (tableau XVI). Toutefois, pour des indices spasmolytiques égaux, tous les indices ayant trait à l'histamine sont beaucoup plus faibles pour la « Propavine » que pour le 929 F.

La comparaison entre les indices spasmolytiques et antihistaminiques, telle qu'elle ressort des résultats consignés dans le tableau XV, permet de constater un certain parallélisme entre l'antagonisme qu'exercent ces éthers phénoliques vis-à-vis de l'histamine et vis-à-vis du BaCl_2 .

NUMÉRO DU PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	SÉRIE CHIMIQUE
Papavérine.		(Spasmolytique).
« Propavine ».	$\begin{matrix} \text{C}_3\text{H}_7 \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{matrix} \text{CH CO. O. CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	(Spasmolytique).
929 F	$\begin{matrix} \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Phénoxyéthylamine.
1379 F	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ (\text{CH}_3)_2\text{CH} \end{matrix} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Phénoxyéthylamine.
1655 F	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Phénoxyéthylamine.
1482 F	$\begin{matrix} \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Phénoxyéthylamine.
928 F	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Phénoxyéthylamine.
1571 F	$\begin{matrix} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \end{matrix}$	Aniline.
1335 F	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \end{matrix}$	Aniline.
1167 F	$\begin{matrix} \text{H} \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \end{matrix}$	Aniline.
1691 F	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \end{matrix}$	Aniline.
1599 F	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \end{matrix}$	Aniline.
1699 F	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{matrix} \text{N} \begin{matrix} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \end{matrix}$	Aniline.

I. ah., indice antihistaminique (choc); I. ah. i., indice antihistaminique intestinal; I. sp., indice

DOSES ACTIVES tre l'histamine sur l'intestin du cobaye milligrammes	DOSES ACTIVES sur le spasme de l'intestin du lapin en milligrammes	I. AH.	I. AH. I.	I. SP.
0,2	2-5	1	5	20-50
0,2	0,5-1	1,5	5	100-200
0,005-0,01	0,5-1	3	100-200	100-200
0 005-0,01	1-2	3	100-200	50-100
0,04	2-5	2	25	20-50
0,04	2	1	25	50
0,1-0,5	10-50	1	2-10	2-10
0,005-0,01	5-10	4	100-200	10-20
0,04	20	1,5	25	5
0,1	10-50	1	10	2-10
0,01-0,02	2	3	50-100	50
0,04-0,05	2	1,5	20-25	50
0,02	1	1	50	100

molytique.

Le même tableau XV met en évidence la divergence profonde qui sépare les effets spasmolytiques et antihistaminiques des Nphényléthylènediamines. Nous avons en effet noté que toutes les Nphényléthylènediamines à noyau non substitué ne présentaient qu'un faible pouvoir spasmolytique. Or, c'est à ce groupe qu'appartient le 1571 F, le plus actif antihistaminique étudié jusqu'ici. De plus, dans la série du 1571 F comme dans les autres (1167 F, 928 F), l'action spasmolytique augmente par addition des groupements méthyl ou isopropyl sur le noyau, alors que l'on peut noter la diminution de l'action antihistaminique à la suite des mêmes modifications chimiques (1599 F, 1699 F).

TABLEAU XVI.

PRODUIT	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX				INDICES			
	Effet spasmolytique sur l'intestin du lapin dose active en milligramme	Effet antihistaminique sur l'intestin du cobaye dose active en milligramme	Effet antihistaminique Bronchoconstriction histaminique p. 100	Antagonisme sur la toxicité de l'histamine en d. m. m.	I. Sp.	I. ah. i.	I. ah. b.	I. ah. c.
929 F.	0,5-1	0,005-0,01	9	3	100-200	100-200	88	3
« Propavine ». .	0,5-1	0,2	38	1,5	100-200	5	52	1,5

I. Sp., indice spasmolytique; I. ah. i., indice antihistaminique intestinal; I. ah. b., indice antihistaminique bronchique; I. ah. c., indice antihistaminique (choc).

3° L'action antihistaminique du 1571 F semble plus spécifique que celle du 929 F, puisque, tout en présentant une action spasmolytique beaucoup plus faible sur le spasme intestinal du lapin, le 1571 F possède la même activité antihistaminique sur l'intestin de cobaye et une activité supérieure sur le choc histaminique du même animal.

La plus grande spécificité du 1571 F se manifeste aussi par sa faible action sur l'intestin de cobaye vis-à-vis des excitations provoquées par le BaCl₂ et l'acétylcholine (graphique IX).

II

MODE D'ACTION

Nous étant proposé, au début de ce travail, de rechercher des produits synthétiques susceptibles de s'opposer à l'action de l'histamine, nous avons conclu à l'activité de deux groupes de corps nettement distincts chimiquement : les phénoxyéthylamines et les Nphényléthylènediamines (6). Ce fait pose immédiatement un problème physiologique infiniment délicat, celui de la nature de l'antagonisme ainsi constaté. Puisque le test employé dans nos recherches est justement le choc histaminique du cobaye, nous avons été amenée à rechercher par quelle transformation l'organisme du cobaye devient capable de résister à plusieurs doses mortelles d'histamine. Certes, il n'est pas dans notre intention de trancher une question si complexe : tant de problèmes analogues déjà anciens restent toujours sans réponse. Depuis que Bézoldt, en 1867, introduisit le premier en physiologie la notion d'antagonisme, avec ses expériences sur l'atropine, des exemples semblables ont foisonné, tout spécialement en ces dernières années, après l'introduction de produits synthétiques en physiologie.

Comment l'atropine s'oppose-t-elle aux actions de l'acétylcholine ? Comment l'ergotamine ou le 933 F s'opposent-ils aux actions de l'adrénaline ? Il ne saurait plus être question aujourd'hui de mettre en cause une action paralysante des nerfs sympathiques ou parasympathiques, puisqu'il est démontré que ces nerfs n'agissent justement sur les muscles que par la libération d'un médiateur : adrénaline ou acétylcholine. Certains auteurs ont émis les hypothèses les plus diverses : Clark [16] fait intervenir des « Haptophores » blo-cables par l'antagoniste et rendus, par ce fait, incapables de fixer le poison, d'où l'inactivité de celui-ci. Morrisson et Lis-

(6) Nous avons été heureuse de voir confirmer l'action antihistaminique du 929 F par M. G. R. Rosenthal, de Chicago (communication inédite).

sak [61], au sujet du 933 F, invoquent une destruction plus rapide de l'adrénaline au sein des cellules ; malheureusement, les expériences entreprises dans cette voie ne sont pas encore assez probantes pour permettre l'élaboration d'une théorie et l'on reste toujours dans le domaine des hypothèses.

Il ne pourrait donc être question ici d'expliquer le nouvel antagonisme introduit en physiologie : antihistaminique-histamine. Nous voudrions seulement tirer des faits rapportés dans ce travail quelques réflexions qui, peut-être, permettront de jeter un peu de lumière sur ce problème, en espérant qu'elles aideront à lui trouver plus tard une solution.

RÔLE DES BRONCHES DANS LE CHOC HISTAMINIQUE DU COBAYE

On sait que, selon les recherches classiques de Dale et Laidlaw [23], la mort du cobaye ayant reçu de l'histamine est la conséquence d'un spasme des muscles bronchiques et survient par asphyxie. L'examen des poumons après la mort montre une distension d'autant plus faible que la dose donnée est plus forte. « Un tel résultat, concluent les auteurs, ne peut être imputé qu'à une constriction des bronchioles par spasme de leur revêtement musculaire, quoique l'effet puisse être accentué par l'accroissement simultané de la sécrétion bronchique. »

Nous-même avons pu, d'ailleurs, protéger des cobayes contre une dose mortelle d'histamine en les maintenant sous respiration artificielle ; par contre, si nous avons pu retarder la mort après injection de 2 doses minima mortelles, il nous a été impossible d'empêcher l'action fatale du poison dans ce cas.

RÔLE DES BRONCHES DANS LA PROTECTION.

Puisque les bronches semblent jouer le rôle principal dans l'intoxication histaminique du cobaye, il nous a paru logique de faire porter la protection, exercée par nos antihistaminiques, sur cet organe : le cobaye protégé ne mourrait pas parce que ses bronches seraient moins fortement contractées que celles d'un animal normal. Or, si en étudiant l'action des antihista-

miniques sur la bronchoconstriction, il nous a été possible de constater le parallélisme entre cette action et l'action sur le choc des produits appartenant à une même série chimique, nous avons pu remarquer, par contre, que :

1° Un spasmolytique : la « Propavine », tout en protégeant plus fortement les bronches que le 1655 F contre le spasme histaminique, lui était inférieur en ce qui concerne la survie du cobaye.

2° Certaines Nphényléthylènediamines plus actives sur le choc histaminique que les phénoxyéthylamines leur étaient inférieures dans la protection du poumon (929 F et 1571 F, 1482 F et 1699 F).

3° Certaines Nphényléthylènediamines encore actives sur le choc histaminique du cobaye étaient dépourvues de toute activité sur les bronches (tableau XIII).

La protection des bronches ne peut donc expliquer seule la résistance à l'histamine acquise par l'organisme du cobaye traité. En particulier, si les bronches répondent, dans certains cas, à l'injection d'histamine, chez l'animal protégé et chez l'animal normal, par une égale bronchoconstriction, on est amené à se demander si la différence de comportement des deux animaux vis-à-vis du choc n'est pas en rapport avec une diminution de l'histamine libre dans le sang.

Hanke et Koessler [42] ont montré que l'histamine injectée dans la veine d'un cobaye pouvait être en partie retrouvée dans le foie, l'intestin et l'estomac. Seule, une fraction q de la dose injectée arrive donc jusqu'aux poumons et y provoque le spasme bronchique. On peut imaginer que, chez l'animal protégé, une plus forte proportion de l'histamine injectée se trouve soit fixée, soit détruite dans les viscères, en sorte que les poumons ne recevront plus qu'une faible fraction q/n de la dose d'histamine, ce qui expliquerait la protection exercée sur le choc en dépit de l'inaction du produit observée sur les bronches isolées.

Avec les produits très actifs comme le 1571 F, cette propriété, acquise par l'organisme de retenir une partie de l'histamine, s'ajouterait au pouvoir anticonstricteur observé sur les bronches isolées.

Pour entraîner la mort d'animaux traités par ces produits, il faudrait que les poumons reçussent une quantité mq d'histamine (q étant la quantité d'histamine parvenant aux poumons des animaux normaux après l'injection de 1 dose minima mortelle). D'autre part, après l'injection de 1 dose minima mortelle aux animaux protégés, il ne parviendrait que la fraction q/n' d'histamine à leurs poumons. Il faudra donc leur injecter $m.n'$ doses minima mortelles pour obtenir un choc histaminique fatal. Ce serait ce facteur $m.n'$ que représenteraient nos indices « antihistaminiques » (choc).

La différence observée entre la série des phénoxyéthylamines et celle des Nphényléthylènediamines proviendrait alors de la part plus ou moins grande jouée par l'une ou l'autre de ces actions : le 1371 F et les Nphényléthylènediamines agiraient plus fortement sur la rétention de l'histamine dans l'organisme ; l'action du 929 F et des phénoxyéthylamines porterait plus spécialement sur les muscles bronchiques.

Comment concevoir cette rétention plus grande de l'histamine, dans l'organisme du cobaye ayant reçu l'un de nos antihistaminiques ?

Tentante était l'hypothèse d'une action favorisante des antihistaminiques sur la dégradation de l'histamine, malheureusement aucune preuve expérimentale n'est venue la confirmer.

Il ne peut s'agir en effet, ici, d'une destruction directe de l'histamine par les antihistaminiques. C'est ce que montrent les résultats suivants, conformes à ce que la constitution chimique des produits laissait prévoir. On mélange 0 milligr. 1 de 929 F avec 0 milligr. 01 d'histamine, puis l'on ajoute cette solution au bain de Tyrode-Webster, contenant un fragment d'intestin de cobaye : on obtient alors une contraction plus faible que celle obtenue avec l'histamine seule, mais très nette, contrairement à ce qui se produit lorsque la même quantité d'antihistaminique est ajoutée au bain avant l'histamine (l'action de celle-ci est alors complètement supprimée). Si on laisse pendant quelques heures à l'étuve le mélange précédent, l'action excitante ne disparaît pas, indiquant par là que l'histamine n'a subi aucune destruction.

Puisqu'il n'y avait pas de destruction directe de l'histamine,

nous avons supposé une action favorisante de nos produits sur le mécanisme habituel de dégradation dans l'organisme.

HISTAMINASE.

Il semble bien, depuis quelques années, qu'on puisse rattacher la dégradation de l'histamine, en grande partie, à l'action d'une diastase spécifiquement histaminolytique : l'histaminase.

Best [9], le premier, en 1929, mettait en évidence la présence de cette diastase dans les poumons du bœuf *in vitro*. Ses expériences furent confirmées, dans la suite, par celles de Binet et Marquis [10] sur le poumon de chien *in vivo* et *in vitro*. Eldbacher et Zeller [28] ont pu retrouver l'histaminase dans de nombreux organes de différentes espèces : reins, intestin, foie de cobaye ; reins, foie, intestin de bœuf, etc. Tout récemment, Marcou [58] la décèle dans le sang, contrairement aux résultats négatifs obtenus jusqu'ici par Busson et Kirschbaum [15], Popielski [64] et Koskowski [46]. Enfin, l'activité de l'histaminase extraite de la poudre d'intestin a même pu être mise en évidence *in vivo*. Rigler [66] en Allemagne, Takebayaski [77] au Japon rapportent les résultats obtenus sur quelques intoxications humaines rattachées à l'histamine ; l'auteur japonais a, en outre, établi son action contre les diverses manifestations de l'histamine sur le métabolisme du chat et du lapin.

ACTION DU 1571 F SUR L'HISTAMINASE.

Il nous a paru intéressant de rechercher si l'activité de l'histaminase était augmentée *in vitro* en présence d'un antihistaminique. Les expériences faites dans ce but avec le 1571 F furent malheureusement totalement négatives.

Nous avons opéré suivant une des méthodes décrites par Eldbacher et Zeller [28]. Nous avons utilisé l'histaminase contenue dans la poudre de reins de bœuf, celle-ci ayant été obtenue par dessiccation de l'organe pendant quarante-huit heures dans le vide sulfurique. On laisse en contact 25 grammes de poudre et 500 cent. cubes d'une solution de NaCl à 5 p 100, pendant une heure à 38°, sous agitation constante. Le liquide

recueilli après centrifugation contient la diastase. Pour mettre en évidence la propriété histaminolytique de cet extrait, il suffit de laisser à l'étuve un flacon contenant 10 cent. cubes de l'extrait, 0 milligr. 5 d'histamine, 15 cent. cubes de solution tampon à pH 7 et 2 cent. cubes de toluène, avec barbotage d'oxygène. Après vingt-quatre heures, l'histamine a plus ou moins totalement disparu, comme l'atteste alors un essai du liquide sur l'intestin isolé de cobaye. Si, au lieu de 0 milligr. 5, on ajoute 1 milligramme d'histamine, il n'en disparaît plus qu'une partie, environ la moitié, après séjour de vingt-quatre heures à l'étuve.

Nous avons donc recherché s'il était possible d'obtenir une plus forte destruction de l'histamine en ajoutant au mélange précédent 25 milligrammes de 1571 F (la concentration en antihistaminique atteignant ainsi 1/1.000). La difficulté résidait alors dans le dosage biologique : la présence du 1571 F dans la solution à tester supprimant en effet toute réponse du muscle lisse à l'histamine. Une question primordiale restait donc à résoudre : comment séparer l'antihistaminique et l'histamine? Nous espérons que la faible solubilité du 1571 F dans les solutions alcalines nous permettrait de la résoudre. Malheureusement, tout le 1571 F ne précipite pas et son action se fait encore sentir dans le dosage biologique de la solution filtrée, diminuant la réponse de l'intestin à l'histamine. Nous avons alors réalisé l'expérience suivante. Trois flacons sont mis à l'étuve :

A contenant :

- 10 cent. cubes de l'extrait.
- 1 milligramme d'histamine (1 cent. cube d'une solution au 1/1.000 dans la solution tampon).
- 14 cent. cubes de solution tampon pH 7.
- 2 cent. cubes de toluène.

B contenant :

- 10 cent. cubes de l'extrait.
- 1 milligramme d'histamine (1 cent. cube de la solution précédente).
- 14 cent. cubes de solution tampon.
- 2 cent. cubes de toluène.

C contenant :

- 10 cent. cubes de l'extrait.
- 1 milligramme d'histamine (1 cent. cube de la solution précédente).
- 25 milligrammes de 1571 F (5 cent. cubes d'une solution 5/1.000 dans la solution tampon).
- 9 cent. cubes de solution tampon.
- 2 cent. cubes de toluène.

Vingt-quatre heures après, nous les avons retirés et avons constitué à ce moment un quatrième flacon servant de témoin .

D contenant :

- 10 cent. cubes de l'extrait.
- 1 milligramme d'histamine (1 cent. cube de la solution précédente).
- 14 cent. cubes de solution tampon.
- 2 cent. cubes de toluène.

Au flacon B, nous avons alors ajouté 5 cent. cubes de la solution de 1571 F utilisée pour C ; aux trois autres flacons, 5 cent. cubes de solution tampon.

Après séparation des albumines par acidification puis centrifugation (en vue de faciliter le filtrage ultérieur), après neutralisation, on ajoute 2 cent. cubes de soude normale à chacun des flacons. Les quatre extraits sont filtrés sur noir animal, puis neutralisés par 2 cent. cubes d'acide chlorhydrique normal : ils sont prêts pour l'essai biologique sur l'intestin isolé de cobaye.

Deux fractions du même intestin ont alors été préparées. Sur l'une d'elles, nous avons essayé successivement 1 cent. cube des flacons D, A, B ; sur l'autre, 1 cent. cube des flacons D, A, C. Nous avons noté les contractions correspondant aux différentes préparations :

Première série :

Histamine.	(Histamine + histaminase)	(Histamine + histaminase) + 1571 F
	24 heures à l'étuve.	24 heures à l'étuve.
D	A	B

Deuxième série :

Histamine.	(Histamine + histaminase)	(Histamine + histaminase + 1571 F)
	24 heures à l'étuve.	24 heures à l'étuve.
D	A	C

Le rapport entre les contractions obtenues dans les deux séries reste le même, permettant de conclure à la même quantité d'histamine dans les flacons C et B. Donc la présence du 1571 F n'augmente pas l'action histaminolytique de l'histaminase *in vitro*.

CONCLUSION.

L'expérience montre que la résistance à l'histamine acquise par l'organisme du cobaye, après l'injection de nos antihistaminiques, ne peut s'expliquer totalement par la protection des bronches contre le spasme histaminique. On semble alors en droit d'invoquer une action particulière, encore inexplicable, grâce à laquelle seule une partie de l'histamine parviendrait aux poumons de l'animal protégé. Cette propriété, particulièrement marquée pour le 1571 F et les éthylènediamines tétrasubstituées, expliquerait la différence observée entre les produits de cette série chimique et ceux des autres séries au cours de l'étude relative aux rapports entre la constitution chimique et l'action antihistaminique (tableau V).

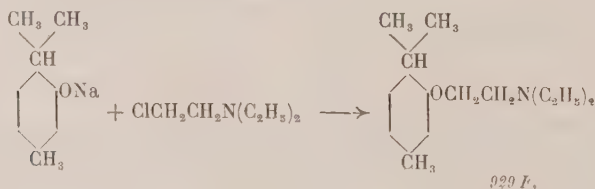
III

ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE DU 929 F ET DU 1571 F

Devant la supériorité présentée par le 929 F et le 1571 F au cours de cette étude, il nous a semblé intéressant de connaître les propriétés pharmacologiques de ces produits :

A. — LA (2)ISOPROPYL(5)MÉTHYLPHÉNOXYÉTHYLDIÉTHYLAMINE OU THYMOXYÉTHYLDIÉTHYLAMINE (929 F).

Le 929 F s'obtient très facilement par action pendant douze heures du diéthylaminochloréthane sur le thymolate de sodium, en tube scellé à 140°.



La base distille à 160-164° sous 25 millimètres de mercure.

Le chlorhydrate utilisé dans tous les essais physiologiques se présente sous forme de cristaux blancs fondant à 130-131°, bien solubles dans l'eau. On obtient alors une solution légèrement acide (pH 6,4), de laquelle la base précipite par neutralisation.

TOXICITÉ. — Le 929 F est une substance de toxicité moyenne. Voici les doses minima mortelles chez différentes espèces.

ESPÈCES	DOSE MINIMA MORTELLE en gramme par kilogramme	
	Sous-cutanée	Intraveineuse
Cobaye	0,200	0,020
Souris	0,500	0,025
Lapin	0,200	0,025

La marche de l'intoxication par de fortes doses est la même chez les trois espèces : poly et hyperpnée, signes d'excitation médullaire, tremblements convulsifs, raideur des membres, opistotonus, hypothermie.

Les chiffres de toxicité n'ont rien d'anormal si on les compare à ceux de quelques autres produits. Ainsi, la dose intraveineuse mortelle pour le lapin prend place entre celle du (3)diéthylaminométhylbenzodioxan (883 F) : 0 gr. 030 par kilogramme, et celle de la diéthylaminoéthoxy (2)diphényl (1262 F) : 0 gr. 020 par kilogramme. Nous fûmes donc très étonnée de constater la vive intolérance marquée par toutes les espèces pour des doses faibles très éloignées de la dose minima mortelle.

La souris de 20 grammes, qui ne succombe qu'à 10 milligrammes (sous-cutanés), manifeste déjà des signes d'intolérance à 1 milligramme. Le chien éveillé présente des nausées dès l'injection sous-cutanée de 5 milligrammes par kilogramme de 929 F. Enfin, l'homme tolère très mal ce produit. Une heure et demie après l'ingestion d'un cachet de 1 milligr. 5, on a pu noter les symptômes suivants : courbature, spécialement aux muscles fatigués par un exercice antérieur, dyspnée par paralysie du diaphragme, dysphagie, hyper-

sensibilité de la peau, et spécialement du cuir chevelu, polyurie, hypotension.

Si l'on augmente la dose jusqu'à 2 centigrammes, les symptômes s'accroissent. Ils arrivent à un degré de violence tel que le patient est obligé de rester allongé, pris de vomissements, de douleurs musculaires violentes et de céphalées (observations du Dr Henry).

Il est à noter encore une intolérance particulièrement marquée chez un sujet très nerveux : après ingestion de 1 milligr. 5 il présente les troubles précédemment décrits, mais la difficulté à respirer va cette fois jusqu'à l'impression d'étouffement, le sujet est incapable de parler et de se tenir debout. Ce n'est que trois heures plus tard que les signes d'intolérance commencent à disparaître (observation du Dr Joltrain).

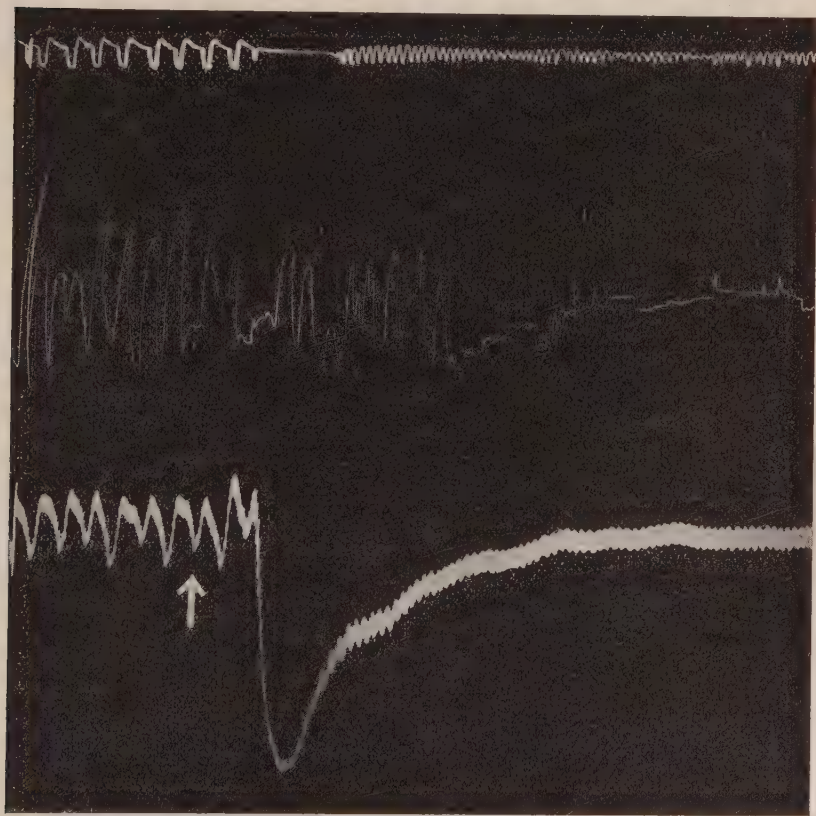
La fatigue musculaire intense caractéristique de cette intolérance rappelle la paralysie flasque observée sur nos animaux et celle notée par Okasaki [62] lorsqu'il donnait de la thymoxyéthylidiméthylamine à des grenouilles. Cet auteur met en évidence l'origine centrale de tels troubles : en excitant le bout périphérique du nerf sciatique au cours de la paralysie, il obtient la réponse normale du muscle. Il n'y a donc pas de paralysie musculaire.

Cette thymoxyéthylidiméthylamine, si voisine du 929 F, est toutefois beaucoup mieux tolérée que ce dernier puisqu'elle est couramment employée en thérapeutique par les Japonais sous le nom de « Tostramine ». Okasaki [62] note d'ailleurs l'absence d'effet émétique chez le chat à la dose de 30 centigrammes, contrairement à l'action du 929 F.

Remarquons enfin que les produits précédemment cités comme termes de comparaison sont parfaitement tolérés par l'homme, l'un, le 883 F, jusqu'à la dose de 15 centigrammes, l'autre, le 1262 F, jusqu'à la dose de 20 centigrammes.

ACTION LOCALE. — Le 929 F est très irritant, l'instillation d'une goutte d'une solution à 1 p. 100 dans l'œil d'un lapin produit immédiatement une vive rougeur accompagnée de larmolement ; l'irritation persiste pendant plusieurs heures. L'injection d'une solution à 1 p. 100 sous la peau du cobaye

provoque généralement une escarre au bout de quelques jours. Enfin, la pénétration du 929 F dans la peau par ionisation provoque un érythème avec papules urticariennes comparable à celui provoqué par l'histamine, mais beaucoup plus atténué que celui-ci.



GRAPHIQUE XIII. — Expérience du 12 janvier 1939. Chien 8 kilogrammes, respiration naturelle. Première ligne, respiration; deuxième ligne, péristaltisme intestinal; troisième ligne, pression carotidienne. En \uparrow injection de 5 milligrammes par kilogramme de 929 F dans la veine saphène.

L'application du 929 F sur la peau ou l'introduction dans le derme n'amène aucune réaction apparente.

CIRCULATION ET RESPIRATION. — Le 929 F est hypotenseur. Sur le chien chloralosé l'injection intraveineuse de 5 milli-

grammes par kilogramme provoque une hypotension forte mais peu durable, elle provoque aussi une forte excitation respiratoire (graphique XIII).

Chez le lapin endormi à l'éther ou au « narcosol » (sel de sodium de l'acide éthobutyléthylbarbiturique), le 929 F est hypotenseur ; dans ce dernier cas, 0 milligr. 25 par kilogramme sont déjà nettement hypotenseurs. On retrouve par là les doses données par Maeda [55] sur le lapin uréthanisé (0 milligr. 5 par kilogramme).

Cette hypotension non modifiée par l'injection préalable d'atropine relève d'une action générale du 929 F sur les capillaires. Elle relève en partie aussi de l'action de ce produit sur le cœur. Ainsi constate-t-on en enregistrant les contractions du cœur de lapin qu'il est fortement déprimé par de grosses doses (4 milligrammes par kilogramme).

MUSCLES LISSES. — C'est l'action excitante de la thymoxy-éthyl-diéthylamine sur l'utérus isolé de lapin qui attira sur elle l'attention des physiologistes japonais. Anan [2] est frappé par la faiblesse des doses actives : la concentration de 1/10.000, d'après lui, produit déjà une contraction de l'utérus. C'est l'ordre de grandeur des doses actives de l'ergotamine. Nous avons même pu obtenir une forte contraction avec 2 milligrammes dans un bain de 100 cent. cubes, ce qui donne une concentration de 2/100.000.

On retrouve cette action excitante sur les muscles bronchiques. Le 929 F est fortement bronchoconstricteur à la dose de 5 milligrammes par kilogramme chez le cobaye (D. Bovet [41]). Cette bronchoconstriction se manifeste encore sur des poumons isolés et perfusés suivant la méthode de Sollmann et Tainter.

Par contre, sur l'intestin, le 929 F agit comme un spasmolytique, il paralyse l'intestin *in situ* du chien chloralosé, détend aux faibles doses (0 milligr. 1 dans un bain de 100 cent. cubes) puis paralyse aux doses moyennes (1 milligr.) l'intestin isolé de lapin.

PROPRIÉTÉS SYMPATHOLYTIQUES. — Les phénomènes de paralysie notés au cours de l'intoxication par le 929 F nous ayant fait penser à quelque action de ce produit sur le système

nerveux central, nous avons recherché s'il ne prolongerait pas la durée de la narcose à l'évipan : aucun résultat positif n'a pu être obtenu.

Par contre, l'action sympatholytique, ou plutôt adrénalino-lytique du 929 F est bien connue. Il diminue l'action hypertensive de doses moyennes d'adrénaline chez le lapin (Okasaki [62], Maeda [55]) et chez le chien (D. Bovet et P. Maderni [12]). Il s'oppose à l'hyperglycémie adrénalinique du lapin (Asakura [4]), mais c'est surtout vis-à-vis des actions musculaires de l'adrénaline qu'il manifeste son action adrénalino-lytique. Il inverse l'action paralysante de l'adrénaline sur l'intestin de lapin isolé (Anan [3], D. Bovet et Maderni [12]), supprime son action excitante sur l'utérus de lapine (Anan [3])(7).

B. — LA NPHÉNYLNÉTHYLN'DIÉTHYLÉTHYLÈNEDIAMINE (1571 F).

Nous avons utilisé dans tous les essais physiologiques le chlorhydrate qui se présente sous la forme de cristaux blancs (p. f. 110°-114°) très facilement solubles dans l'eau et qui s'oxydent légèrement à l'air en prenant de ce fait une teinte grisâtre.

TOXICITÉ. — Le 1571 F peut être placé exactement à côté du 929 F par les chiffres de sa toxicité pour les différentes espèces animales.

ESPÈCES	DOSE MINIMA MORTELLE en gramme par kilogramme	
	Sous-cutanée	Intraveineuse
Cobaye	0,250	0,030
Souris	0,400	0,030
Lapin	0,250	0,025

Les signes d'intoxication se retrouvent les mêmes chez les trois espèces : frayeur, excitation, convulsions, tremblements,

(7) Cette action sympatholytique ne peut être mise en cause dans l'activité antihistaminique du 929 F. Les Japonais ont, en effet, étudié du point de vue sympatholytique plusieurs produits cités dans cet ouvrage (1379 F, 1482 F, 1483 F, etc.), la divergence entre leurs résultats et les nôtres écarte tout rapprochement possible entre l'activité antihistaminique et l'activité sympatholytique d'une même substance.

polypnée. On ne retrouve pas ici la grande intolérance observée pour les faibles doses de 929 F, la souris de 20 grammes supporte parfaitement 2 milligrammes sous-cutanés, mais ceci est particulièrement frappant chez le chien éveillé. Cet animal peut recevoir 20 milligrammes sous la peau sans manifester aucun trouble. Par contre, à 40 milligrammes, les signes d'intoxication sont très violents : ils semblent surtout d'origine centrale. L'animal manifeste tous les signes d'une hyper-excitation : agitation, aboiements. On ne retrouve pas ici l'effet émétique observé avec le 929 F.

ACTION LOCALE. — Le 1571 F est un produit très irritant : une solution au 1/100 neutre au tournesol, injectée sous la peau d'un lapin ou d'une souris produit au bout de quarante-huit heures des escarres telles que la chair est mise à nu. L'instillation d'une goutte de la même solution dans l'œil d'un lapin ne provoque pourtant aucune irritation apparente.

Comme avec le 929 F, l'introduction dans la peau de l'homme du 1571 F par ionisation, provoque un placard érythémateux parsemé de petites papules urticariennes sur toute la largeur de l'électrode.

CIRCULATION. RESPIRATION. — Comme le 929 F, le 1571 F est hypotenseur, toutefois, il l'est moins fortement. Il faut atteindre la dose de 5 milligrammes par kilogramme pour observer, chez le chien chloralosé, une baisse de pression, peu durable d'ailleurs. Cet effet n'est pas empêché par injection préalable d'atropine. On retrouve aussi sur la respiration l'action excitante observée avec le 929 F (graphique XIV).

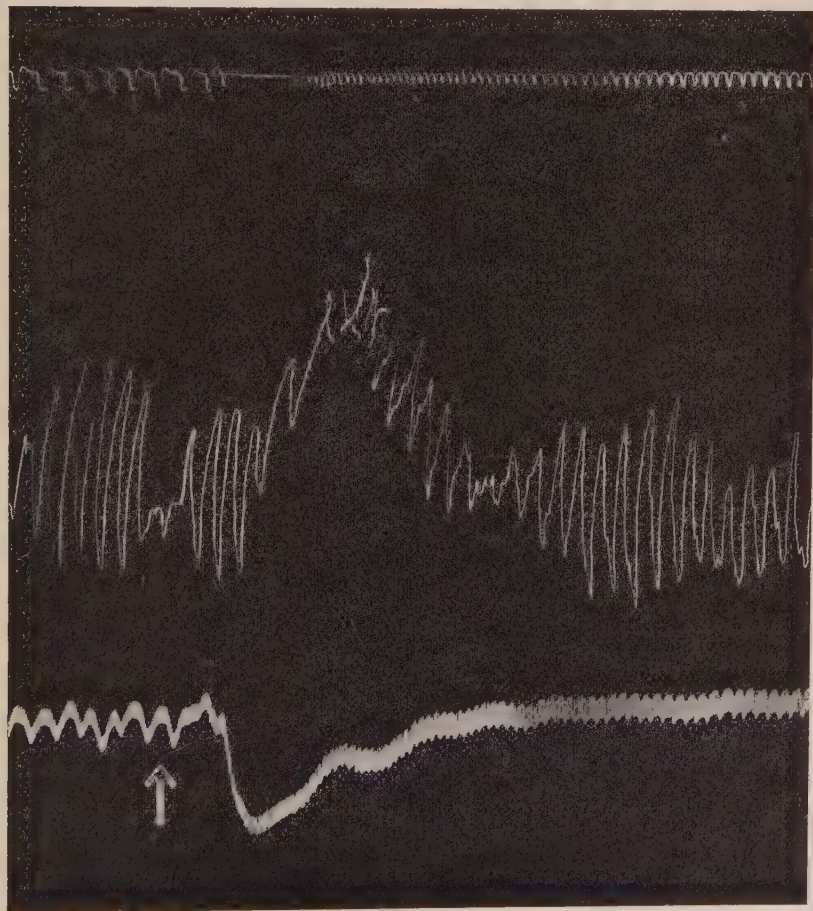
Sur le lapin endormi à l'uréthane ou au « narcosol », le 1571 F a une action hypotensive plus faible, là encore, que celle observée avec le 929 F. Ce que l'on peut rattacher, peut-être, à la faible action déprimante sur le cœur. Cette dépression n'est apparente sur le cœur suspendu de lapin qu'à la dose de 10 miligrammes par kilogramme.

MUSCLES LISSES. — A l'opposé du 929 F, le dérivé de l'éthylènediamine manifeste une action excitante sur l'intestin de chien *in situ* à la dose de 10 milligrammes par kilogramme.

Il élève le tonus de l'intestin de lapin isolé dès la dose de

0 milligr. 5 (dans un bain de 100 cent. cubes). Une concentration plus forte, 1 milligramme, produit l'arrêt du péristaltisme : le muscle restant en contraction tétanique.

Le 1571 F contracte fortement l'utérus isolé de lapin. Dès



GRAPHIQUE XIV. — Expérience du 12 janvier 1939. Chien 8 kilogrammes, respiration naturelle. Première ligne, respiration; deuxième ligne, péristaltisme intestinal; troisième ligne, pression carotidienne. En \uparrow injection de 5 milligrammes par kilogramme de 1571 F dans la veine saphène.

la dose de 0 milligr. 1 (dans un bain de 100 cent. cubes) on obtient une très forte contraction comparable à celle obtenue avec une dose vingt fois plus forte de 929 F.

Enfin, le 1371 F contracte les bronches isolées de cobaye perfusées avec une solution de Tyrode suivant la méthode de Tainter, de la même façon que le 929 F.

IV

ACTION DU 929 F SUR QUELQUES PHÉNOMÈNES IMPUTABLES A L'HISTAMINE

Nous avons mentionné, au début de ce travail, le rôle attribué à l'histamine dans quelques phénomènes pathologiques. Il nous a semblé intéressant de rapporter ici les résultats obtenus avec le 929 F dans deux de ces cas. Nous joindrons à nos propres expériences sur le choc anaphylactique du cobaye, celles que M. Sohier a eu l'amabilité de nous communiquer sur l'intoxication expérimentale du cobaye par l'ypérite.

A. — CHOC ANAPHYLACTIQUE EXPÉRIMENTAL DU COBAYE

La formation d'histamine au cours du choc anaphylactique n'est plus à démontrer aujourd'hui. Dès 1910, les premières expériences de Manwaring [56] sur des chiens à circulation croisée, reprises plus tard par Tinel, Ungar et Zerling [80], établissaient la présence d'un principe actif dans le sang des chiens en état de choc. Ce principe actif a pu être identifié à l'histamine pendant ces dernières années par un grand nombre d'auteurs. Nous-même, en collaboration avec A. Simon [68], avons pu doser l'histamine présente dans le sang de cobaye, faisant un choc à la suite d'une injection d'arsénobenzol dans le ganglion lymphatique inguinal.

D'autre part, la formation d'histamine au cours du choc anaphylactique a été mise tout spécialement en évidence sur le foie du chien et les poumons du cobaye. Nous ne retiendrons que les résultats relatifs à ces derniers, puisque c'est sur le cobaye que nos expériences ont porté.

Bartosh, Feldberg et Nagel [7] montrent successivement :

1° Que le liquide perfusant un poumon sensibilisé, isolé, contracté ensuite par apport d'antigène, entraîne des subs-

tances qui se montrent bronchoconstrictrices sur un poumon normal.

2° Que ce perfusât a acquis d'autres propriétés : il contracte l'intestin isolé de cobaye, il possède une action hypotensive et adrénalinosécrétrice chez le chat atropinisé.

3° Que cette substance active est, comme l'histamine, stable à l'ébullition et soluble dans les alcools méthylique et éthylique.

Ces résultats, confirmés par Spinelli [72] puis Daly, Peat et Schild [25], sont complétés par ceux de Daly et Schild [26]. Ces auteurs montrent que la substance active du perfusât résiste à l'ébullition acide, comme l'histamine, et que ce perfusât de choc est inactivé par des préparations d'histaminase.

Ungar et Parrot [82 et 83] reprennent la question et mettent en évidence l'histamine dans une solution physiologique additionnée d'antigène dans laquelle baigne un fragment de poumon sensibilisé. Ces mêmes auteurs, en collaboration avec A. Levillain [85], établissent que sous l'action de l'acide ascorbique cette même formation d'histamine ne peut avoir lieu, confirmant par là l'hypothèse de Hochwald, selon qui l'acide ascorbique protégeait les animaux contre le choc en empêchant l'histamine de se former.

Certes, il n'est pas dans notre intention d'attribuer à la seule histamine tout le rôle dans le choc anaphylactique ; le problème est d'une autre complexité, et cela est apparu une fois de plus dans les récentes expériences de Lissak et Hodes [53]. Ces auteurs ont obtenu une protection contre le choc anaphylactique du chat avec le (3)pipéridinométhylbenzodioxan (933 F) sans qu'il puisse s'agir ni d'une action sympatholytique (l'ergotamine n'agit pas) ni d'une action antihistaminique (le choc histaminique n'est pas évité). Du moins le rôle partiel de l'histamine semble-t-il certain ; la protection obtenue avec l'acide ascorbique est particulièrement éloquente sur ce point.

Nous avons donc recherché si le 929 F, dont nous avons établi les propriétés antihistaminiques, ne pourrait pas s'opposer au choc anaphylactique *in vivo* et *in vitro*. Nous avons choisi le cobaye comme animal d'expérience parce que c'est,

d'une part, l'espèce sur laquelle le choc anaphylactique mortel se manifeste de la façon la plus constante et que, d'autre part, c'est cet animal que nous avons utilisé dans toutes nos recherches sur les antihistaminiques.

1° *In vivo*. — Les cobayes ont été sensibilisés par deux injections intra-péritonéales de 0 c. c. 5 de sérum de cheval à quarante-huit heures d'intervalle ; au bout de vingt et un jours l'injection déchainante était faite dans la veine à la dose de 0 c. c. 25 à 1 cent. cube.

Nous avons alors constaté qu'en administrant une demi-heure avant l'injection déchainante de sérum et par voie sous-cutanée une dose de 40 milligrammes de 929 F, il était possible d'observer une action protectrice nette de cette substance.

TABLEAU XVII.

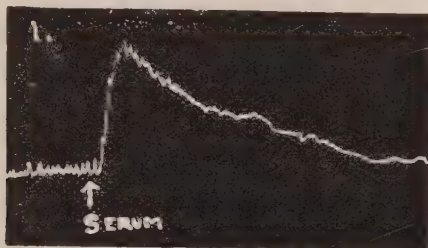
NUMÉRO	POIDS en grammes	929 F voie sous-cutanée en milligrammes par gramme	SÉRUM voie intraveineuse en centimètre cube	OBSERVATIONS
<i>Témoins :</i>				
1.	390		1	Mort en 4 minutes.
2.	320		1	Mort en 6 minutes.
3.	320		0,5	Mort en 2 minutes.
4.	300		0,5	Mort en 3 minutes.
5.	450		0,5	Mort en 2 minutes.
6.	480		0,25	Mort en 3 minutes.
7.	450		0,25	Mort en 3 minutes.
8.	300		0,25	Mort dans la nuit.
<i>Protégés :</i>				
9.	360	40	1	Mort en 35 minutes.
10.	460	40	1	Mort en 23 minutes.
11.	320	40	1	Choc, survie.
12.	390	40	0,5	Pas de choc, survie.
13.	440	40	0,5	Pas de choc, survie.
14.	420	40	0,5	Choc, survie.
15.	460	40	0,5	Choc, survie.
16.	480	40	0,5	Mort en 4 minutes.

Nous donnons dans le tableau XVII le protocole résumé d'une expérience.

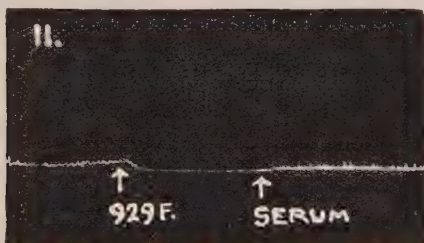
Les cobayes ayant reçu du 929 F montrent soit une prolongation du temps de survie, par rapport aux animaux témoins

(à la dose de 1 cent. cube de sérum), soit une survie définitive (à la dose de 0 c. c. 5).

La protection ainsi assurée est momentanée. Elle ne semble pas en outre, dans nos expériences, s'accompagner de phénomènes importants de désensibilisation. Les animaux protégés et ayant survécu ont reçu à nouveau la même dose de sérum,



I, action de 2 cent. cubes de sérum sur l'intestin immergé dans la solution de tyrode pure.



II, action de 2 cent. cubes de sérum sur l'intestin après adjonction de 929 F (1/100.000).

GRAPHIQUE XV. — Action du 929 F sur le phénomène de Dale.

un, deux ou sept jours après la première injection déchaînante. ils sont alors morts dans un laps de temps identique à celui observé chez les témoins. Par contre, S. R. Rosenthal, reprenant la même question en Amérique, observe une certaine désensibilisation. Des animaux protégés ayant survécu ne font pas de choc lorsqu'on leur injecte une nouvelle dose déchaînante vingt-quatre heures après la protection.

L'opposition entre ces résultats provient peut-être de la différence entre les doses déchaînantes nécessaires pour obtenir

un choc mortel dans les deux séries d'expériences : 0 c. c. 4-0 c. c. 15 pour l'auteur américain, 0 c. c. 25 à 0 c. c. 75 pour nous.

2° *In vitro*. — Utilisant les expériences de Dale [21] sur les réactions anaphylactiques des organes isolés, nous avons étudié sur les fragments d'intestin provenant de cobayes sensibilisés trois semaines auparavant par la technique précédemment décrite, la sensibilité au sérum de segments baignant soit dans une solution de Tyrode-Webster pure, soit dans une solution de Tyrode-Webster contenant du 929 F.

Quatre fragments de la région terminale de l'iléon sont simultanément prélevés et immergés dans quatre récipients de 100 cent. cubes, leurs contractions étant enregistrées par un myographe à levier, le 929 F est ajouté au liquide de Tyrode-Webster de deux des baigns de façon à obtenir une concentration de 1 p. 100.000 dans chacun de ceux-ci, puis 2 cent. cubes de sérum sont ajoutés à chacun des récipients. On constate dans ces conditions que les intestins immergés dans la solution de Tyrode pure se contractent violemment sous l'action du sérum, alors que les intestins traités par le 929 F ne se contractent pas. Il est ainsi possible de mettre en évidence la protection exercée par le 929 F vis-à-vis d'une réaction anaphylactique en dehors de toute action centrale (fig. XV).

L'action protectrice du 929 F dans le choc anaphylactique ajoute un nouvel argument en faveur du rôle joué par l'histamine dans ce phénomène.

B. — INTOXICATION EXPÉRIMENTALE DU COBAYE A L'YPÉRITE.

Lorsqu'on injecte sous la peau d'un cobaye une émulsion d'ypérite dans de l'eau physiologique, on observe :

1° Une très forte réaction locale.

2° De nombreux troubles généraux : troubles nerveux (convulsions, stupeur), nausées, diarrhée, hypotension, hypothermie.

La présence d'une grosse réaction locale fait dire à M. Sohier, dans sa conférence sur les « caustiques vésicants » [69] :

« Il semble bien que très peu du toxique en nature puisse

diffuser dans l'économie... On arrive donc à douter que ce soit le produit lui-même qui, répandu dans l'organisme, provoque à distance des symptômes aussi diffus. » D'où l'idée d'un toxique intermédiaire. La pathogénie de l'intoxication rappelant beaucoup les troubles consécutifs à l'injection d'histamine, et surtout l'histaminémie du chien ypérite, suggèrent à M. Sohier que l'histamine intervient dans le déterminisme des phénomènes généraux auxquels succombent les animaux ypérites.

C'est en partant de cette hypothèse que fut recherchée l'action protectrice du 929 F sur le cobaye ypérite.

L'antihistaminique est injecté sous la peau (40 milligrammes par kilogramme) à des intervalles de temps variables après l'injection d'ypérite. Tous les animaux ainsi traités ont montré soit une prolongation du temps de survie, plus ou moins longue, soit même une survie définitive. Notons que c'est la première fois qu'une telle protection peut être observée, toute une série de sympatholitiques et de sympathomimétiques ayant été essayés préalablement sans succès.

Là encore, l'action protectrice du 929 F apporte donc un nouvel argument en faveur de la théorie histaminique.

Par ces deux exemples, on voit l'intérêt que pourraient présenter nos antihistaminiques dans l'étude de phénomènes où l'histamine semble jouer un rôle ; aussi avons-nous le ferme espoir que ces deux faits expérimentaux seront le point de départ de toute une série de recherches nouvelles.

CONCLUSIONS

Dans cette étude de quelques produits antagonistes de l'histamine, nos recherches ont abouti aux conclusions suivantes :

1° Prenant comme test de comparaison le nombre de doses minima mortelles d'histamine nécessaires pour tuer le cobaye ayant reçu préalablement 5 milligrammes du produit dans la veine, nous avons pu mettre en évidence la supériorité d'action de deux produits, la (2)isopropyl(5)méthylphénoxyéthyl-diéthylamine (929 F) après laquelle le cobaye ne succombe qu'à

l'injection de 3 doses minima mortelles, et la NphénylNéthyl-N'diéthyléthylènediamine (1571 F), après laquelle il faut donner 4 et 5 doses minima mortelles pour obtenir la mort de l'animal.

2° Etudiant les rapports entre la constitution chimique et l'activité antihistaminique de quelques dérivés des phénoxyéthylamines et des éthylènediamines, nous avons pu montrer :

a) L'infériorité des amines secondaires et primaires par rapport aux amines tertiaires (phénoxyéthyl-diéthylamines et N'diéthyléthylènediamines).

b) La similitude d'action des phénoxyéthyl-diéthylamines et des NphénylN'diéthyléthylènediamines portant les mêmes groupements sur le noyau benzénique. L'activité croît suivant l'ordre suivant :

Méthylphényl — diméthylphényl — isopropylméthylphényl.

Les positions réciproques des groupements sur le noyau ne semblent pas entrer en cause.

c) L'activité très particulière des éthylènediamines tétra-substituées :

$$\text{N phényl N} \left\{ \begin{array}{l} \text{méthyl,} \\ \text{éthyl N'diéthyléthylènediamine,} \\ \text{isopropyl.} \end{array} \right.$$

Le maximum d'activité étant obtenu avec l'alcoyl, éthyl (1571 F), les mêmes modifications du noyau benzénique, favorables dans les cas précédents, deviennent alors nettement défavorables, l'activité devenant même nulle avec la combinaison : méthylisopropylphényl.

3° L'antagonisme vis-à-vis de l'histamine de tous ces produits ne se révèle pas seulement sur le choc histaminique du cobaye, mais encore sur les excitations provoquées par l'histamine sur les muscles lisses (intestin, estomac, utérus, bronches).

4° Cet antagonisme ne se manifeste pas dans les phénomènes vasculaires, sauf dans les cas où l'histamine provoque une hypertension, celle-ci se trouvant alors inversée (lapin en état de profonde narcose).

5° L'action antihistaminique manifeste sur les muscles lisses ne peut pas être rattachée à une action parasympatholy-

tique. Elle ne peut être que partiellement rattachée à une action spasmolytique, celle-ci étant particulièrement faible chez les éthylènediamines tétrasubstituées.

6° On ne peut pas rattacher entièrement la résistance à l'histamine, acquise par l'organisme du cobaye sous l'action d'un antihistaminique, à la protection des bronches contre le spasme histaminique. Celle-ci, attribuable en partie à une action spasmolytique, jouerait le principal rôle dans l'activité du 929 F. Elle n'entrerait que partiellement en jeu dans la protection exercée sur le cobaye par le 1571 F. Il faudrait invoquer alors une action proprement antihistaminique, grâce à laquelle seule une faible fraction de l'histamine injectée parviendrait jusqu'aux poumons. Aucun fait expérimental ne permet actuellement d'élucider cette action proprement antihistaminique. Les expériences ayant trait à l'action du 1571 F sur l'activité histaminolytique de l'histaminase *in vitro* furent totalement négatives.

7° L'étude pharmacologique des deux principaux antihistaminiques : 929 F et 1571 F ne présente pas de particularités frappantes. A noter seulement la très grande intolérance de toutes les espèces animales (même l'homme) pour les faibles doses de 929 F.

8° La protection exercée par le 929 F dans le choc anaphylactique expérimental du cobaye et l'intoxication du même animal par l'ypérite, ajoute un nouvel argument en faveur du rôle joué par l'histamine dans ces deux phénomènes. Elle souligne l'intérêt que peuvent présenter nos antihistaminiques dans tous les phénomènes où le rôle de l'histamine a pu être invoqué.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ACKERMANN (D.) et KUTSCHER (Fr.). *Zeit. f. Biol.*, **54**, 1910, p. 387.
- [2] ANAN (S.). *Fol. Pharm. Jap.*, **9**, 1929, p. 6, cité par Lévy (J.) et Justin-Besançon (L.). Congrès de Médecine française, 1936.
- [3] ANAN (S.). *Jap. Journ. med. Sc. Trans. IV Pharm.*, 1930, p. 70, cité par Lévy (J.) [51].
- [4] ASAKURA (L.). *Fol. Pharm. Jap.*, **17**, 1933, p. 9.
- [5] LA BARRE (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **94**, 1926, p. 1021.
- [6] BARSOUM (G. S.) et GADDUM (J. H.). *Journ. of Phys.*, **85**, 1935, p. 1.
- [7] BARTOSCH (R.), FELDBERG (W.) et NAGEL (E.). *Pflüger's Arch.*, **231**, 1932-1933, p. 616.

- [8] BERNHEIM (F.). *Journ. of Pharm. a. exp. Therap.*, **42**, 1931, p. 441.
- [9] BEST (C. H.). *Journ. of Physiol.*, **67**, 1929, p. 256.
- [10] BINET (L.) et MARQUIS (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **418**, 1935, p. 1285.
- [11] BOVET (D.). *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1934, p. 1020.
- [12] BOVET (D.) et MADERNI (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **414**, 1933, p. 980.
- [13] BOVET (D.), LESTRANGE (Y. de) et FOURNEAU (J. P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **430**, 1939, p. 1192.
- [14] BOVET (D.), TREFOUËL (J.), STERNE (J.) et STRIKLER (H.). *C. R. Soc. de Biol.*, **430**, 1939, p. 29.
- [15] BUSSON (B.) et KIRSCHBAUM (P.). *Centrbl. f. Bakt. (Origin.)*, **65**, 1912, p. 507.
- [16] CLARK (A. J.). *General pharmacology. Handbuch der exp. Pharm. Vierter Band* J. Springer, Berlin, 1937.
- [17] CODE (C. F.). *Journ. of Phys.*, **89**, 1937, p. 257.
- [18] CODE (C. F.). *Journ. of Phys.*, **90**, 1937, p. 501.
- [19] CORDIER (D.) et MAGNE (H.). *Ann. de Physiologie*, **3**, 1927, p. 486.
- [20] CORNIL (L.) et MALMEJAC (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **129**, 1938, p. 680.
- [21] DALE (H. H.). *Journ. of Pharm. a. exp. Therap.*, **4**, 1913, p. 167.
- [22] DALE (H. H.), BAUER (W.) et RICHARDS (W.). *Lancet*, **216**, 1929, p. 1179.
- [23] DALE (H. H.) et LAIDLAW (P. P.). *Journ. of Phys.*, **44**, 1910-1911, p. 318.
- [24] DALE (H. H.) et LAIDLAW (P. P.). *Journ. of Phys.*, **43**, 1912, p. 182.
- [25] DALY (I. de Burgh), PEAT (S.) et SCHILD (H.). *Quart. J. of exp. Phys.*, **25**, 1935, p. 33.
- [26] DALY (I. de Burgh) et SCHILD (H.). *Journ. of Phys.*, **83**, 1934-1935, p. 3.
- [27] DICKER (E.). *C. R. Soc. de Biol.*, **99**, 1928, p. 341.
- [28] ELDBACHER (S.) et ZELLER (A.). *Helv. chim. Acta*, **20**, 1937, p. 717.
- [29] ERLÉNMEYER (H.) et BERGER (E.). *Biol. Zeit.*, **252**, 1932, p. 22.
- [30] FELDBERG (W.). *Revue de Pharm. et Thérap. expéte*, **2**, 1933, p. 311.
- [31] FELDBERG (W.) et SCHILF (E.). Histamin, seine Pharmakologie und Bedeutung für die Humoralphysiologie. J. Springer, Berlin, 1930.
- [32] FELDBERG (W.) et SCHILF (E.). Histamin. J. Springer, Berlin, 1930, p. 339.
- [33] FELDBERG (W.) et SCHILF (E.). Histamin. J. Springer, Berlin, 1930, p. 175.
- [34] FIERENS (B.) et de NAYER (P. P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **122**, 1926, p. 805.
- [35] FROMHERZ (K.). *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **173**, 1933, p. 86.
- [36] FUJII. *Journ. Biophysics*, **1**, 1924, p. 42, cité d'après FELDBERG et SCHILF [31], p. 209.
- [37] FUJIKAWA (J.). *Jap. Journ. Med. Sc. IV Pharm.*, **11**, 1938, p. 17 ; *Chem. Abstr.*, **32**, 1938, p. 8582.
- [38] GAJDOS. *Paris Médic.*, **46**, 1938, p. 509.
- [39] GUGGENHEIM (M.) et LÖFFLER (W.). *Biochem. Zeit.*, **72**, 1916, p. 303.
- [40] GUILLOT (M.) et ONG SIAM GWAN. *C. R. Soc. de Biol.*, **126**, 1937, p. 318.
- [41] HALPERN (B. N.). *C. R. Soc. de Biol.*, **126**, 1937, p. 678.
- [42] HANKE (N. T.) et KOESSLER (K. K.). *Journ. of biol. Chem.*, **59**, 1924, p. 879.

- [43] HASHIMOTO (H.). *Arch. int. Med.*, **35**, 1925, p. 609, cité par FELDBERG et SCHILF [31], p. 338.
- [44] KEETON (R. W.), LUCKARDT (R. B.) et KOCH (F. C.). *Am. Journ. of Physiol.*, **51**, 1920, p. 469.
- [45] KLISIECKI (A.) et HOLOBUT (W.). *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **186**, 1937, p. 57.
- [46] KOSKOWSKI (W.). *C. R. Soc. de Biol.*, **95**, 1926, p. 509.
- [47] KRISHNAN (B. T.). *Ind. Journ. of med. Research*, **25**, 1937, p. 95.
- [48] LAMSON (R. W.). *Proc. Soc. expt. Biol. a. Med.*, **26**, 1928, p. 612.
- [49] LEE (P. H.) et KIM (M. S.). *J. Severance Union Med. Coll.*, **3**, 1937, p. 74.
- [50] LESCHKE (E.). *Zeit. f. expt. Path. u. Ther.*, **14**, 1919, p. 151.
- [51] LÉVY (J.). *Paris Méd.*, n° 29, 1935, p. 67.
- [52] LÉVY (J.) et DITZ (E.). *Arch. int. de Pharm. et Therap.*, **47**, 1934, p. 138.
- [53] LISSAK (K.) et HODES (B. R.). *Am. Journ. of Phys.*, **124**, 1938, p. 637.
- [54] MACKAY (M. E.). *Am. Journ. of Phys.*, **95**, 1930, p. 527.
- [55] MAEDA (T.). *Fol. pharm. Jap.*, **18**, 1933, p. 79.
- [56] MANWARING (W. H.). *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, **21**, 1910, p. 275.
- [57] MANWARING (W. H.), OSEPIAN (V. M.), O'NEIL (P. L.) et MOY (H. B.). *Journ. of Imm.*, **10**, 1925, p. 575.
- [58] MARCOU (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 573.
- [59] MOGENA (H. G.) et FERNANDEZ (A. L.). *Arch. Verdgskrkh*, **42**, 1922, p. 104, cité d'après FELDBERG et SCHILF [30], p. 336.
- [60] MOLINARI-TOSATTI (P.). *Boll. Soc. Biol. sper.*, **3**, 1929, p. 928, cité par FELDBERG et SCHILF [31], p. 154.
- [61] MORRISON (R. S.) et LISSAK (K.). *Am. Journ. of Phys.*, **123**, 1938, p. 404.
- [62] OKASAKI (L.). *Jap. Journ. of med. Sc.*, **6**, 1931, p. 133.
- [63] PAL (J.). *Dtsch. med. Woch.*, 1912, p. 1774.
- [64] POPIELSKI (L.). *Pflüger's Arch.*, **178**, 1920, p. 214.
- [65] RESCHAD (S. G.). *Arch. f. expt. Path. u. Pharm.*, **188**, 1938, p. 247.
- [66] RIGLER (R.). *Münch. med. Woch.*, **83**, 1936, p. 15.
- [67] SCHMIDT (G. W.) et STAHELIN (Ad.). *Ztschr. f. Imm. forsch.*, **60**, 1929, p. 222.
- [68] SIMON (A.) et STAUB (A. M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 815.
- [69] SOHIER (R.). *Les caustiques vésicants*. Vigot frères, Paris, 1939.
- [70] SOLLMANN (T.) et PILCHER (J. D.). *Journ. of Pharm. a. exp. Therap.*, **9**, 1917, p. 309.
- [71] SOLLMANN (T.) et von OETTIGEN (W. F.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **25**, 1928, p. 692.
- [72] SPINELLI (A.). *Soc. intern. di micr. Boll. dell. sez. ital.*, **4**, 1932, p. 257.
- [73] SPOR. Diss. Breslau (1920), cité par FELDBERG et SCHILF [31], p. 336.
- [74] STARLING (E. H.). *Proc. roy. Soc. Med.*, **7**, 1914, p. 29 (therap.).
- [75] SUGIMOTO (I.). *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **74**, 1913, p. 27.
- [76] SZAKALL (A.). *Arch. f. Path. u. Pharm.*, **148**, 1930, p. 218.
- [77] TAKEBAYASHI (H.). *Zeit. f. Chirurg.*, **249**, 1937, p. 256.
- [78] TAINTER (M. L.), PEDDEN (A. R.) et JAMES (M.). *Journ. of Pharm. a. exp. Therap.*, **31**, 1934, p. 371.

- [79] THORNTON (J. W.). *Quart. Journ. exp. Phys.*, **21**, 1932, p. 305.
[80] TINEL (J.), UNGAR (G.) et ZERLING (M. R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, p. 1150.
[81] UNGAR (G.). *Journ. de Phys. Path. gén.*, **34**, 1936, p. 77.
[82] UNGAR (G.) et PARROT (J.-L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **123**, 1936, p. 676.
[83] UNGAR (G.) et PARROT (J.-L.). *Ann. de Phys.*, **13**, 1937, p. 939.
[84] UNGAR (G.), PARROT (J.-L.) et BOVET (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **124**, 1937, p. 445.
[85] UNGAR (G.), PARROT (J.-L.) et LEVILLAIN (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 1015.
[86] VANYSEK (Fr.). *Biol. Zeit.*, **67**, 1914, p. 221.
[87] VIOTTI (C.). *C. R. Soc. de Biol.*, **91**, 1924, p. 1085.
[88] WARNANT (H.). *Arch. int. de Pharm. et Therap.*, **37**, 1930, p. 61.
[89] WEBER (E.). *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1914, p. 63.
[90] WEBSTER (M. D.). *Journ. of Pharm. a. exp. Therap.*, **53**, 1935, p. 340.
[91] WEISS (S.), ELIIS (L. B.) et ROBB (G. P.). *Ann. Journ. Phys.*, **90**, 1929, p. 551.
[92] YAMAUCHI (M.). *Arb. med. Univers. Okayama*, **1**, 1928, p. 14, cité par FELDBERG et SCHILF [31], p. 186.

Le Gérant : G. MASSON.